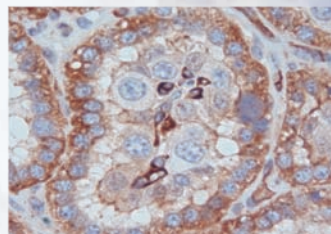
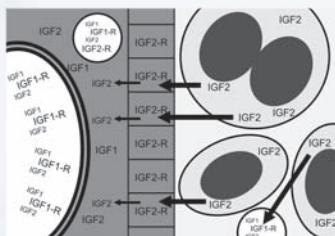


**Expression des Insulin-like Growth Factor Systems in
Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität
sowie bei Graviditäten aus in-vitro Embryoproduktion
mit dem pathologischen Erscheinungsbild
„Large Offspring Syndrome“**

Peter Richterich



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

**Expression des Insulin-like Growth Factor Systems in
Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität sowie bei
Graviditäten aus in-vitro Embryoproduktion mit dem
pathologischen Erscheinungsbild „Large Offspring Syndrome“**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Peter Richterich

Tierarzt aus Linnich

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler
Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Tag der Disputation: 16. Dezember 2008

für Papa

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 2. LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 2.1. Rinderplazenta | 3 |
| 2.1.1. Klassifizierung | 3 |
| 2.1.2. Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau | 5 |
| 2.2. Insulin-like Growth Factor (IGF) System und seine Bedeutung für plazentares Wachstum und Differenzierung | 7 |
| 2.2.1. Liganden des IGF-Systems | 8 |
| 2.2.2. Rezeptoren des IGF-Systems | 12 |
| 2.2.3. Bindungsproteine des IGF-Systems | 14 |
| 2.3. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen an Fetus und Plazenta beim Rind | 18 |
| 2.3.1. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen am Fetus: Large Offspring Syndrome (LOS) und Abnormal Offspring Syndrome (AOS) | 18 |
| 2.3.2. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen an der Plazenta: Large Placenta Syndrome (LPS) | 23 |
| 2.4. Epigenetik | 26 |
| 2.4.1. Definition und Bedeutung | 27 |
| 2.4.2. Epigenetische Reprogrammierung des Genoms | 29 |
| 2.4.3. Zusammenhang zwischen epigenetischen Störungen und LOS | 32 |
| 2.4.4. Störungen der Genregulation beim LOS | 35 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 39 |
| 3.1. Untersuchungsziele | 39 |
| 3.2. Probengewinnung und Probenkonservierung | 39 |
| 3.2.1. Probenmaterial zur Untersuchung der Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität | 39 |
| 3.2.2. Probenmaterial zur Untersuchung der Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus IVP- bzw. MOET-Trächtigkeiten am 80. Graviditätstag | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.3. Probenkonservierung ----- | 45 |
| 3.2.4. Statistische Auswertung der Daten zu Größe und Gewicht der Feten aus den IVP- und MOET-Gruppen ----- | 45 |
| 3.3 Untersuchungen ----- | 46 |
| 3.3.1. Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels konventioneller RT-PCR --- | 46 |
| 3.3.1.1. RNA-Isolierung aus den Plazentomen----- | 46 |
| 3.3.1.2. Konventionelle RT-PCR ----- | 47 |
| 3.3.1.2.1. DNase-Behandlung----- | 47 |
| 3.3.1.2.2. Reverse Transkription (RT)----- | 48 |
| 3.3.1.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)----- | 49 |
| 3.3.1.2.4. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte----- | 51 |
| 3.3.1.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ----- | 53 |
| 3.3.2. Quantitative Messung der Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR----- | 53 |
| 3.3.2.1. TaqMan-Sonden Verfahren----- | 54 |
| 3.3.2.2. Real-Time RT-PCR ----- | 55 |
| 3.3.2.2.1. Durchführung der Real-Time RT-PCR ----- | 55 |
| 3.3.2.2.2. Auswertung der Real-Time RT-PCR ----- | 58 |
| 3.3.2.3. Statistische Auswertung der mittels Real-Time RT-PCR gemessenen relativen Genexpression----- | 59 |
| 3.3.3. Immunhistochemische Untersuchungen ----- | 61 |
| 3.3.3.1. Immunhistochemische Darstellung von IGF1, IGF2 und IGF1-R ----- | 62 |
| 3.3.3.2. Immunhistochemische Darstellung des IGF2-R----- | 63 |
| 3.3.3.3. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen----- | 64 |
| 3.3.3.4. Statistische Auswertung der immunreaktiven Scores----- | 66 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4. Alphabetische Liste der verwendeten Puffer, Lösungen, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte ----- | 67 |
| 3.4.1. Puffer und Lösungen ----- | 67 |
| 3.4.2. Reagenzien ----- | 69 |
| 3.4.3. Verbrauchsmaterialien ----- | 71 |
| 3.4.4. Geräte ----- | 71 |
| 4. ERGEBNISSE ----- | 73 |
| 4.1. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität und unter der Geburt ----- | 73 |
| 4.1.1. IGF1 ----- | 73 |
| 4.1.1.1. Expression auf mRNA-Ebene ----- | 73 |
| 4.1.1.2. Expression auf Proteinebene ----- | 75 |
| 4.1.2. IGF2 ----- | 79 |
| 4.1.2.1. Expression auf mRNA-Ebene ----- | 79 |
| 4.1.2.2. Expression auf Proteinebene ----- | 81 |
| 4.1.3. IGF1-R ----- | 85 |
| 4.1.3.1. Expression auf mRNA-Ebene ----- | 85 |
| 4.1.3.2. Expression auf Proteinebene ----- | 87 |
| 4.1.4. IGF2-R ----- | 94 |
| 4.1.4.1. Expression auf mRNA-Ebene ----- | 94 |
| 4.1.4.2. Expression auf Proteinebene ----- | 96 |
| 4.1.5. IGFBP-Expression auf mRNA-Ebene ----- | 101 |
| 4.1.5.1. IGFBP-1 ----- | 101 |
| 4.1.5.2. IGFBP-2 ----- | 103 |
| 4.1.5.3. IGFBP-3 ----- | 105 |
| 4.1.5.4. IGFBP-4 ----- | 108 |
| 4.1.5.5. IGFBP-5 ----- | 110 |
| 4.1.5.6. IGFBP-6 ----- | 112 |
| 4.1.5.7. IGFBP-7 ----- | 115 |

| | |
|--|------------|
| 4.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer nach Superovulation (MOET) und aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktion-Protokollen (IVP1 und IVP2) ----- | 117 |
| 4.2.1. Beschreibung der MOET- und IVP-Feten----- | 117 |
| 4.2.1.1. Scheitel-Steiß-Länge----- | 118 |
| 4.2.1.2. Brustumfang----- | 119 |
| 4.2.1.3. Gewicht----- | 120 |
| 4.2.1.4. Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Länge----- | 121 |
| 4.2.2. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus MOET sowie aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP1, IVP2)----- | 122 |
| 4.2.2.1. IGF1----- | 122 |
| 4.2.2.2. IGF2----- | 124 |
| 4.2.2.3. IGF1-R----- | 127 |
| 4.2.2.4. IGF2-R----- | 129 |
| 4.2.2.5. IGFBP-1----- | 132 |
| 4.2.2.6. IGFBP-2----- | 134 |
| 4.2.2.7. IGFBP-3----- | 137 |
| 4.2.2.8. IGFBP-4----- | 140 |
| 4.2.2.9. IGFBP-5----- | 143 |
| 4.2.2.10. IGFBP-6----- | 146 |
| 4.2.2.11. IGFBP-7----- | 148 |
| 5. DISKUSSION----- | 151 |
| 5.1. Untersuchungsziele----- | 151 |
| 5.2. Methodische Aspekte----- | 151 |
| 5.3. Ergebnisse----- | 153 |
| 5.3.1. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt----- | 153 |
| 5.3.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer nach Superovulation (MOET) und In vitro-Produktion (IVP)- | 161 |
| 5.3.2.1. Tierexperiment und Phänotyp der MOET- und IVP-Feten----- | 161 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.2.2. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus MOET und IVP auf mRNA-Ebene----- | 164 |
| 5.4. Schlussfolgerungen ----- | 167 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG----- | 168 |
| 7. SUMMARY ----- | 172 |
| 8. LITERATURVERZEICHNIS ----- | 175 |
| 9. ANHANG----- | 211 |
| 9.1. Abkürzungsverzeichnis----- | 211 |
| 9.2. Bisher aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen ----- | 213 |
| 9.2.1. Abstracts für Poster und Vorträge ----- | 213 |
| 9.2.2. Vorträge und Poster ohne Abstracts ----- | 214 |
| 10. DANKSAGUNG----- | 215 |
| 11. ERKLÄRUNG ----- | 217 |

1. EINLEITUNG

Nach der Anwendung biotechnischer Verfahren in der Rinderzucht, wie der in vitro-Produktion von Embryonen (IVP) oder des somatischen Nukleustransfers (SCNT), wurden seit deren Einführung gehäuft abnormale Graviditäten beobachtet. Farin et al. (2006) gaben dem hierbei auftretenden breiten Spektrum fetaler Anomalien die Bezeichnung „Abnormal Offspring Syndrome“ (AOS). Eines der beeindruckendsten Erscheinungsbilder des AOS ist der zum Teil deutlich ausgeprägte fetale Überwuchs, weshalb in der Vergangenheit auch synonym die Begriffe „Large Offspring Syndrome“ (LOS) bzw. „Large Calf Syndrome“ verwendet wurden (Walker et al, 1996; Young et al, 1998). Mit dem LOS sind häufig pathologische Veränderungen an der Plazenta assoziiert, die teilweise dem fetalen Überwuchs vorausgehen. Daher schlugen Constant et al. (2006) die Bezeichnung „Large Placenta Syndrome“ (LPS) vor.

Die Pathogenese des AOS, LOS oder LPS ist noch weitgehend unklar. Ergebnisse von Untersuchungen zu diesem Thema lassen jedoch erkennen, dass die Störung epigenetischer Mechanismen in der frühen Embryonalphase eine wichtige Rolle spielt (Farin und Farin, 1995). Gegenstand der bisherigen Forschung waren daher vorwiegend epigenetische Veränderungen bzw. deren Auswirkungen auf Genexpressionsmuster, wobei die Blastozyste bzw. der eigentlichen Fetus im Vordergrund standen. Veränderungen im Bereich der Plazenta fanden bisher vergleichsweise geringe Beachtung. Makroskopische und histopathologische Untersuchungen von Constant et al. (2006) an Graviditäten aus somatischem Nukleustransfer legen jedoch einen kausalen Zusammenhang zwischen Plazentaaberrationen und fetalem Überwuchs nahe.

Um die Ätiologie und Pathogenese LOS-assoziiierter Plazentaaberrationen weiter aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichende Untersuchungen an Rinderplazentomen aus Graviditäten mit bzw. ohne fetalen Überwuchs durchgeführt. Als Untersuchungsgegenstand wurde ein Wachstumsfaktorensystem gewählt, welches für die embryonale und fetale Entwicklung sehr bedeutsam ist (Fowden, 2003): das Insulin-like Growth Factor (IGF) System. Weiterhin war

aufgrund von Studien an Feten auf epigenetischer Ebene das LOS mit Störungen in der Expression des IGF-Systems in Verbindung gebracht worden (Hiendleder et al., 2004a; 2004 b).

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Real-Time RT-PCR quantitativ auf Unterschiede in der Expression des IGF-Systems zwischen Plazentomen aus LOS- und normalen Graviditäten zu untersuchen. Im Vorfeld zu diesen Studien wurden Expressionsprofile des IGF-Systems auf mRNA-Ebene erstellt, da bisher kaum Informationen zum Vorkommen und zur möglichen Bedeutung des IGF-Systems in Rinderplazentomen vorlagen. Für die Liganden und Rezeptoren des IGF-Systems wurde zusätzlich eine Detektion auf Protein-Ebene mittels Immunhistologie durchgeführt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Rinderplazenta

2.1.1. Klassifizierung

Die Plazenta besteht allgemein aus einem fetalem (*pars fetalis*) und einem maternalen (*pars uterina*) Anteil und bildet ein temporäres Organ, welches für die Dauer einer Trächtigkeit Bestand hat. Neben dem für den Konzeptus lebenswichtigen Stoffaustausch mit der Mutter durch ein verzweigtes Gefäßsystem (Mossman, 1937; Steven 1975) ist die Plazenta als Syntheseort wichtiger Regelfaktoren bzw. Hormone bekannt, die die Gravidität erhalten (Hoffmann, 1994; Dantzer und Leiser, 1998; Hoffmann und Schuler, 2002; Schuler et al., 2002; 2005).

Aufgrund der Beteiligung fetaler Strukturen am Aufbau beschreiben Leiser und Kaufmann (1994) die Plazenta der Wiederkäuer, wie auch die der meisten anderen Säugetiere, als *allantochorialen* Typ. Die *pars fetalis* der Plazenta löst sich physiologischerweise vollständig nach der Geburt aus den Karunkelkrypten, ohne dass es zu einem nennenswerten Verlust maternalen Gewebes kommt. Das Rind besitzt somit eine sogenannte *adeziduate Plazenta*, *Semiplazenta* oder *Halbplazenta* (Strahl, 1906), hier kommt es zu einer Aneinanderlagerung von Chorion und Uterusmucosa ohne Reduktion der Mucosa (Grosser, 1909, 1927). Die intensive Kontaktaufnahme mit Verzahnung von fetalem und maternalem Gewebe der Plazenta ist bei den Wiederkäuern nicht kontinuierlich über die gesamte Plazentaoberfläche ausgebildet, sondern auf multiple diskrete Bezirke begrenzt. Daher ergänzt Grosser (1909) die Bezeichnung in *Semiplacenta multiplex sive cotyledonaria*. Er bezeichnet den Anteil chorionalen Ursprungs der feto-maternalen Verbindungsstrukturen als *Kotyledone* und beschreibt sie als inselförmige, isolierte auf dem glatten Chorion stehende Zottengruppe, welche in die von der Mutter stammende Karunkel, abgeleitet von *Carunculae* (Strahl, 1906), einwachsen. Diese Einheit bezeichnet Strahl (1906) als *Plazentom* (Abb. 2.1).

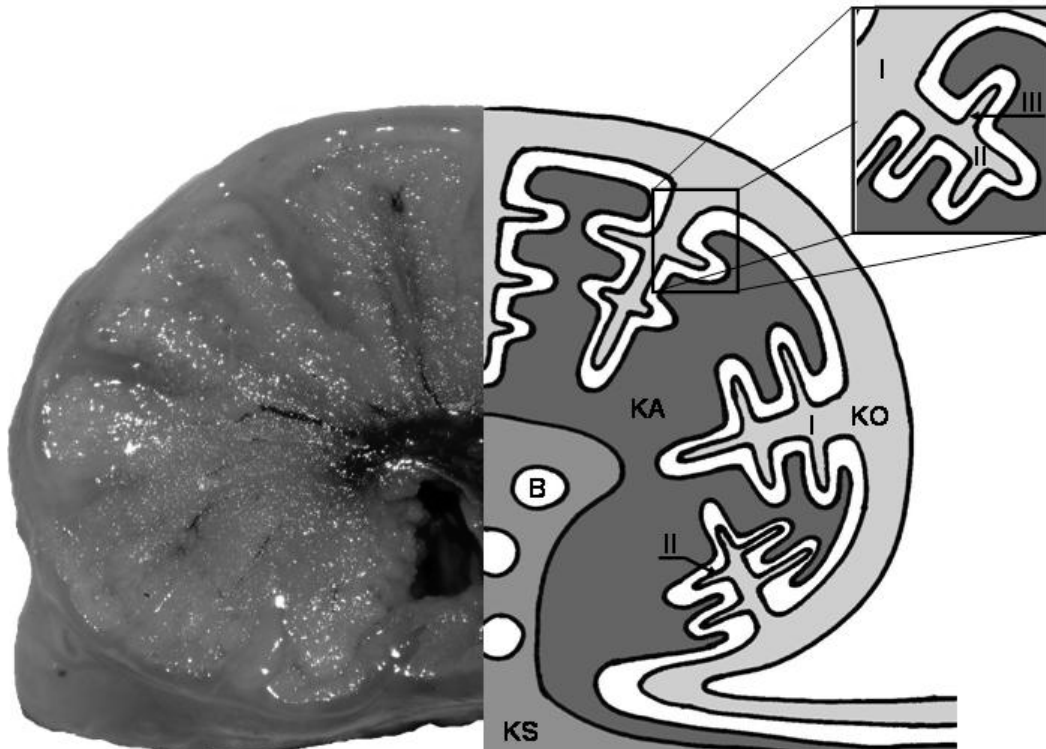


Abb. 2.1: Makroskopischer Querschnitt durch ein Rinderplazentom, etwa 140. Tag der Gravidität. Links Fotografie, rechts Schemazeichnung mit Ausschnitt. KO = Kotyledone; KA = Karunkel; KS = Karunkelstiel; B = maternales Blutgefäß; I, II und III = Primär-, Sekundär- und Tertiärzotte (nach Rüsse, 1998; modifiziert).

In der Theorie ist die Plazentaschranke aus maximal sechs Schichten aufgebaut, welche auf der maternalen Seite aus Endothel der Kapillaren, Bindegewebe und Epithel (Karunkel­epithel) bestehen. Ihnen gegenüber findet man auf der fetalen Seite Trophoblast, Bindegewebe und fetales Endothel. In Abhängigkeit von der Spezies kann es je nach Invasivität des Trophoblasten zu einer unterschiedlich ausgeprägten Reduktion der Gewebeschichten auf der maternalen Seite kommen. Eine entsprechende schematische Einteilung der Plazenta nach trennenden Schichten wurde von Grosser (1927) erstellt. Er verwendet für die Wiederkäuer den Begriff *Placenta syndesmochorialis*, weil bei Hirsch und Schaf ausgedehnte Epithelzerstörungen im oberflächlichen Teil der Krypten zu finden sind, wodurch das Chorionepithel mit dem maternalen Bindegewebe Kontakt aufnimmt (Strahl, 1906). In den Rinderplazentomen konnten derartige Abbauvorgänge im Bereich der Karunkel in der frühen und mittleren Gravidität kaum gefunden werden, so dass man die Rinderplazenta als *epitheliochorial* klassifiziert (Björkman, 1954; Björkman and Bloom, 1957). Dieses Erkenntnis wurde auch durch

elektronenmikroskopische Studien bestätigt (Leiser und Kaufmann, 1994; Dantzer und Leiser, 1998). Schoon (1989) fand allerdings in der Spätphase der Gravidität auch beim Rind einen fortschreitenden Abbau des Karunkelepithels, wodurch es nach seiner Ansicht zur Wandlung einer ursprünglichen *Placenta epitheliochorialis* zu einer *Placenta syndesmochorialis* komme. Hingegen fand Sobiraj (1992) zum Zeitpunkt der Geburt einen Verlust des Karunkelepithels nur in oberflächlichen Bereichen von Primärkrypten, wobei es sich seiner Meinung nach auch um einen präparationsbedingten Artefakt handeln könnte. Er lehnte daher die Bezeichnung *Placenta syndesmochorialis* für die Plazenta des Rindes ab.

2.1.2. Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau

Die Plazenta besteht beim Rind physiologischerweise aus 70–180 Plazentomen (Grosser, 1909, 1927; Björkman 1954), so dass Andresen (1927) die Rinder den *Polykotyledontophoren*, im Gegensatz zu den *Oligokotyledontophoren* wie Reh mit 3-5 oder Hirsch mit 10-12 Plazentomen (Strahl, 1906; Grosser, 1909, 1927; Björkman 1954), zuordnet. Die Karunkeln sind in beiden Uterushörnern jeweils symmetrisch in Reihen angeordnet. Im Uterus des Rindes finden sich in den Hornspitzen in zwei, in der Mitte in drei und in Richtung *Corpus uteri* in vier Reihen (Björkman 1954). Die Karunkeln werden bereits in der Fetalphase angelegt und ausgebildet, sie können im fetalen (4.-5. Monat) und später auch im juvenilen Uterus als Schleimhautverdickung erkannt werden (Grosser, 1909, 1927; Atkinson et al. 1984). Da die Karunkeln als maternale Grundlage für die Plazentome dienen, findet sich eine entsprechende Verteilung der Kotyledonen im Allantochorion, dabei sind Plazentomdurchmesser und -anzahl im fruchttragenden Horn deutlich größer als im nicht-fruchttragenden Uterushorn (Björkman 1954).

Leiser (1975) zeigt einen detaillierten Ablauf über die frühe Implantationsphase des Rindes auf. Am 22. Tag post inseminationem (p.i.) konnten alle Implantationsvorgänge (Vorkontakt-, Appositions-, Adhäsions- und eigentliches Implantationsstadium) nebeneinander betrachtet werden. Hierbei zeigten embryoferne Bereiche „frühere“ Implantationsvorgänge als embryonahe, in denen die Implantation zu diesem Zeitpunkt bereits weiter fortgeschritten war. Der Trophoblast ist am 22. Tag p.i. dem Epithel der Uterushornspitzen nur angelagert, dieses bezeichnet Leiser (1975) als Vorkontaktstadium. Der „freie“ Trophoblast und das Uterusepithel sind morphologisch nicht verbunden und eine eindeutige Trennlinie ist

zu erkennen. Das Appositionsstadium ist gekennzeichnet durch eine unregelmäßige Kontaktzone und zeigt demnach eine beginnende engere embryo-maternale Verbindung, welche bis in die Drüsenmündungen des Endometriums hinein erkennbar ist. Im Bereich des Embryos kann man am 22. Tag p.i. Uterusepithel und Trophoblast makroskopisch nur undeutlich voneinander abgrenzen, dieses bezeichnet man als Adhäsionsstadium. Im Gewebeschnitt hat sich die Kontaktzone zwischen fetalem und maternalem Gewebe verbreitert und es kommt zu diesem Stadium der Implantation zu einer *Interdigitation* des fetalen und maternalen Epithels. Das Endometrium zeigt bei manueller Ablösung des Chorions eine Aufrauung an dieser Stelle, was mit einer abgeschlossenen Implantation an dieser Position gleichzusetzen ist. Björkman (1954) verweist auf fragile Zusammenhänge zwischen dem Uterusepithel und Trophoblast am 33. Tag post ovulationem und bezeichnet sie schon als Plazentome. Zwischen dem 80. und 95. Tag der Gravidität ist die Plazentation weitgehend abgeschlossen, das Plazentom besitzt eine konvexe, pilzartige Form, in den weiteren Trächtigkeitstagen kommt es im Wesentlichen nur noch zur Größenzunahme (Grosser, 1909, 1927; Björkman 1954). Zu diesem Zeitpunkt ist die Karunkel komplett von der Kotyledone umwachsen, und sie setzt sich vom restlichen Uterus durch einen Karunkelstiel, bestehend aus *Stratum spongiosum* des Uterusepithels, ab (Björkman, 1954). Kotyledone und Karunkel sind komplementär interdigitierend ineinander verwachsen. Einem fetalen Zottenbaum aus Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten steht auf maternaler Seite ein korrespondierendes Kryptensystem gegenüber. Durch diese Oberflächenvergrößerung ist ein intensiver Stoffaustausch zwischen Fetus und Mutter gewährleistet (Strahl, 1906; Grosser, 1909, 1927; Leiser, 1975).

Mikroskopisch können im einschichtigen Chorionepithel des Rindes zwei unterschiedliche Zellpopulationen dargestellt werden (Björkman, 1954; Leiser, 1975; Wooding und Wathes 1980). Dies sind zum einen die uninukleären Trophoblastzellen (einkernig, polarisiert, basalmembranständig) und die Trophoblastriesenzellen (meist zweikernig, gelegentlich kommt auch nur ein Kern bzw. mehrere Kerne vor, nicht polarisiert), welche auch als Trophoblast Giant Cells, Diplokaryozyten oder Binucleated Cells bezeichnet werden (Klisch et al., 1999). Der zweite Zelltyp ist schon sehr früh zu Beginn der Plazentation zu finden (Leiser, 1975) und ist charakteristisch für viele Wiederkäuer. Die Trophoblastriesenzellen entstehen i.d.R. durch zwei azytokinetische Mitosen plus eine weitere S-Phase und weisen danach

meist einen DNA-Gehalt von $2x$ ($4n$; $8C$) auf (Wooding, 1982; Klisch et al., 1999). Die charakteristischen glykoproteinhaltigen Granula signalisieren eine mature Zelle (Wimsatt, 1951).

Die Trophoblastriesenzellen haben im Gegensatz zu den uninukleären Trophoblastzellen vermutlich keine adsorptive Funktion, da kein Mikrovillisaum und keine speziellen entsprechenden Strukturen vorhanden sind, die eine solche erfüllen könnten. Vielmehr produzieren sie eine Vielzahl von Botenstoffen (Wooding, 1992). Trophoblastriesenzellen der Wiederkäuer haben die Fähigkeit, aus dem fetalen Kompartiment in das maternale zu migrieren und mit dem Karunkelepithel zu fusionieren. Durch diese Zellmigration wird ein feto-maternales Synzytium gebildet, dieses beobachtet man beim Rind vor allem unmittelbar nach dem Beginn der Plazentation. Im weiteren Verlauf der Gravidität kommt es beim Rind durch die Verschmelzung einer Trophoblastriesenzelle mit jeweils einer Karunkelepithelzelle im Wesentlichen nur zur Ausbildung von dreikernigen Hybridzellen, während bei Schaf und Ziege ausgedehnte feto-maternale Synzytien mit zahlreichen Kernen bis zur Geburt beobachtet werden (Wooding und Wathes, 1980; Wooding, 1992). Dennoch wird auch beim Rind in der neueren Literatur die Plazentation als synepithelial bezeichnet (Dantzer und Leiser, 1998). Die Granula einer reifen Trophoblastriesenzelle werden auf der maternalen Seite nach der Fusion entlassen und die Hybridzellen gehen nach der Sezernierung in den maternalen Kreislauf zugrunde (Björkman, 1968; Wooding und Wathes, 1980). Diesem Zelluntergang der Trophoblastriesenzellen liegt eine Apoptose zugrunde (Schuler et al., 2000).

2.2. Insulin-like Growth Factor (IGF) System und seine Bedeutung für plazentares Wachstum und Differenzierung

Das Insulin-like Growth Factor (IGF)-System setzt sich aus zwei Liganden (IGF1 und IGF2; Baker et al., 1993), zwei Rezeptoren (IGF1-R und IGF2-R; Baker et al., 1993; Lau et al. 1994) und spezifischen Bindungsproteinen (IGFBP; Rechler, 1993; Jones und Clemmons, 1995; Clemmons, 1997; Rosenfeld; 1998) zusammen. In den folgenden Abschnitten sollen diese Elemente näher beschrieben werden.

2.2.1. Liganden des IGF-Systems

Die Insulin-like Growth Factors (IGF1 und IGF2) sind Polypeptide mit einer Größe von etwa 7 kDa und einer sehr großen strukturellen Gemeinsamkeit mit Proinsulin (Han und Carter, 2000; Baker et al. 1993). Beide Faktoren können die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen stimulieren (Rinderknecht und Humbel, 1978) und haben einen regulatorischen Einfluss auf Metabolismus, Mitoserate und Steuerung des fetalen und plazentaren Wachstums mit antiapoptotischer Wirkung (Abb. 2.2; Jones und Carter, 1995; De Meyts und Whittaker, 2002). Sie sind regulatorische Faktoren im Zellzyklus, die die fetale DNA-Replikation und Zellproliferation fördern sowie antiapoptotische Wirkung besitzen, was an Embryonen und fetalen Zelllinien in vitro gezeigt werden konnte (Han und Fowden, 1994; Gardner et al., 1999). IGF2 ist für das embryonale, fetale und plazentare Wachstum bedeutsamer als IGF1, so entdeckten Liu et al. (1991) und Baker et al. (1993) bei der Maus eine Entwicklungsstörung der Plazenta bei Abwesenheit von IGF2, jedoch nicht beim Fehlen von IGF1. IGF2-Knockout-Mäuse besitzen eine deutlich kleinere Plazenta als der Wildtyp. Abu-Amero et al. (1998) verglichen die IGF- bzw. IGF-R-Expression in Plazenten aus normalen Schwangerschaften mit der Expression in Plazenten intrauterin wachstumsretardierter Kinder (Intrauterine Growth Retardation/Restriction, IUGR) und fanden signifikant höhere IGF2- und IGF1-R-mRNA-Konzentrationen im Fall einer intrauterinen Wachstumsretardation. Sie interpretierten diesen Befund als Ausdruck einer Gegenreaktion auf den Minderwuchs.

Salmon und Daughaday formulierten 1957 die „Somatomedinhypothese“, nach der Wachstumshormon (GH) nicht direkt das Wachstum des Organismus fördert, sondern IGF1, welches GH-abhängig in der Leber produziert wird. Dieses IGF1 wirkt in diesem Zusammenhang als endokriner Wachstumsfaktor. Diese ursprüngliche Hypothese wurde mehrfach modifiziert und ergänzt. IGF1 wird nicht nur in der Leber, sondern auch in zahlreichen anderen Organen exprimiert (Isaksson et al., 1982; LeRoith et al., 2001). Isaksson et al. (1982) bezeichneten IGF1 aus der Leber als einen endokrinen und in den anderen Organen als auto- bzw. parakrinen Wachstumsfaktor. Versuche mit leberspezifischen Knock-out-Mäusen zeigten, dass in der Leber exprimiertes IGF1 nicht für das Wachstum alleine verantwortlich ist, jedoch einen bedeutenden Einfluss auf die Serum-IGF1-Konzentration hat. Die Größe zwischen Wildtyp und Knock-out war nicht zu unterscheiden (Sjorgen et al,

1999; Yakar et al., 1999). IGF1 aus der Leber wurde mit diesem Versuch lediglich eine stoffwechselkontrollierende Aufgabe zugewiesen. Hoeflich et al. (2004) untersuchten an auf Größenwachstum selektierten Mäuselinien die Körpergröße und die IGF1-Serumkonzentration. Hier zeigte sich jedoch, dass die Größe mit der Serumkonzentration assoziiert ist, was doch auf eine Bedeutung von systemischem IGF1 als endokriner Wachstumsfaktor hindeutet.

Während der Gravidität ist systemisches IGF1 des Fetus wichtig für die Verteilung der Nährstoffe zwischen Fetus und Plazenta und fördert so das fetale Wachstum (Bauer et al., 1998). Der Sauerstoffpartialdruck ist antiproportional und die Glukosekonzentration proportional im fetalen Schafblut mit der IGF1-Konzentration korreliert (Carr et al., 1995, Fowden, 2003). Beim Schaf klassifiziert man die IGF1-mRNA in Klasse 1 und Klasse 2, abhängig vom Anfangspunkt der Transkription, beginnend bei Exon 1 oder 2. Das gebildete Protein ist nach der Translation aber identisch (Gilmour et al., 1994). Klasse 2-IGF1-mRNA wird bei adulten Tieren exprimiert, wohingegen im fetalen Organismus zuerst Klasse 1-IGF1-mRNA und dann später gegen Ende der Trächtigkeit Klasse-2 IGF1-mRNA gebildet wird (Li et al., 1996). Der Hauptsyntheseort von IGF1 im Fetus ist die Leber und die Skelettmuskulatur (Yakar, 2002), es wird aber auch in vielen anderen fetalen Geweben gebildet (D'Ercole, 1991). In der humanen Plazenta wird IGF1 hauptsächlich in den ersten beiden Trimestern exprimiert (Mills et al., 1986).

Bei wiederholten Glukokortikoidgaben an hochgravide Schafe wurde eine Unterdrückung der fetalen IGF1-Expression beobachtet, die gewebespezifisch ausgeprägt war (Gluckmann und Butler, 1983; Fowden et al., 1996). Auch bei praepubertären Mäusen kann man diesen Effekt von Glukokortikoidbehandlungen beobachten: die IGF1-Proteinexpression in den Wachstumsfugen der Tibia war reduziert und dementsprechend die Körpergröße signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren (Smink et al., 2003). Bei Schaffeten ist eine bessere Muskelreifung und eine daraus resultierende Geburtsgewichtssteigerung durch IGF1 dokumentiert (Lok et al., 1996).

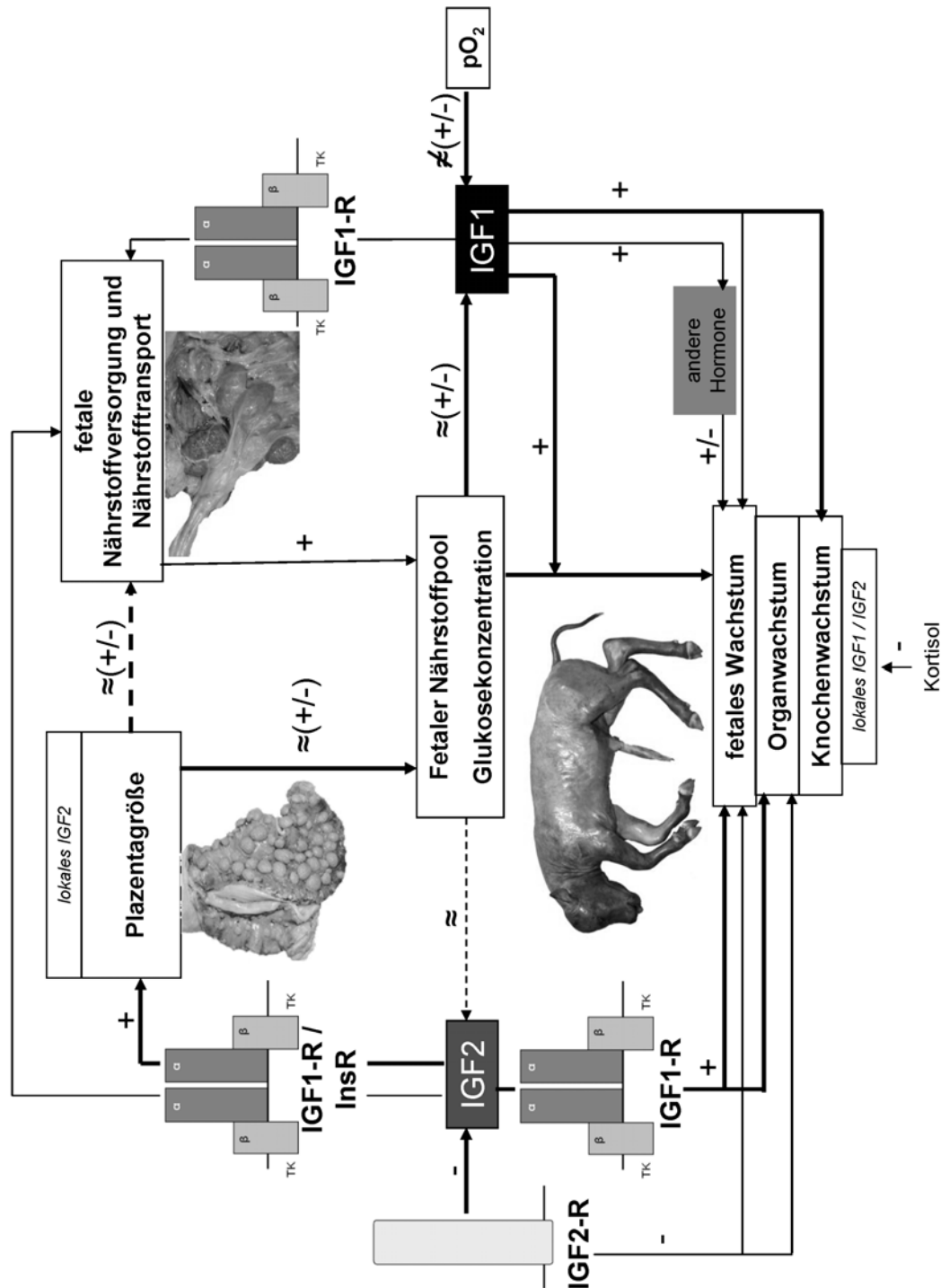


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der IGF1- und IGF2-Wirkungen bei der embryonal/fetalen Entwicklung. IGF2 ist entscheidend für die Plazentagröße und steigert zusammen mit IGF1 die fetale Nährstoffversorgung und damit das Wachstum des Fetus. IGF1, IGF2 = Liganden; IGF1-R, IGF2-R, InsR = Rezeptoren; + = fördernde, - = hemmende Wirkung, \approx bzw. \neq = proportionale bzw. antiproportionale Abhängigkeit; \rightarrow = starker, \rightarrow = schwacher, $\cdots\rightarrow$ = vermuteter Einfluss (nach Fowden, 2003; modifiziert).

Versuche mit IGF2-Knock-out-Mäusen zeigen bei homozygoten Tieren ein Geburtsgewicht von 60% des physiologischen Durchschnitts. Bei eingehenden Untersuchungen an heterozygoten Tieren fand man eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung zwischen dem Allel maternaler und paternaler Herkunft. Ein Knock-out des maternalen Allels zeigt keine Wachstumsveränderungen im Neonaten, jedoch ist eine Inaktivierung des paternalen Allels mit einer Wachstumsretardation, wie bei den homozygoten Knock-outs, verbunden (DeChiara et al., 1990,1991). Diese Studien zeigten, dass IGF2 ein „imprinted gene“ ist. Nur das paternale Allel wird in Plazenta und in fetalen Geweben exprimiert (Ferguson-Smith et al., 1991; Constancia et al., 2002). Eine IGF2-Überexpression führt bei Mäusen feten zu einer Organomegalie, Ödembildung und kardialen Abnormalitäten verbunden mit einer deutlich erhöhten Letalität während der Geburt (Lau et al., 1994; Louvi et al., 1997). IGF2 kontrolliert das plazentare Angebot und die fetale Aufnahme der maternalen Nährstoffe (Constancia et al., 2002). Beide IGFs werden von der frühen Embryonalphase an im Embryo exprimiert, in der späten Trächtigkeit ist die fetale Serumkonzentration von IGF2 bis um das 10fache höher als die von IGF1, dieses wurde in unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Rind, Schaf, Schwein, Primaten, Ratten und Mäusen, gezeigt (Daughaday et al, 1982; Jones et al., 1987; Gluckman et al., 1993; Lee et al, 1993; Owens et al., 1994; Tarantal und Gargosky et al., 1995; Holland et al., 1997). Nach der Geburt ändert sich dieses Verhältnis sehr schnell zu Gunsten von IGF1. IGF2 besitzt im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen nur eine relativ unbedeutende Funktion im Stoffwechsel (Jones und Clemmons; 1995).

IGF2-mRNA besteht bei allen untersuchten Spezies aus 10 Exons, die bei der Transkription als eine Prae-Pro-Form ausgebildet wird. Die mature Form von IGF2-mRNA besteht aus den Exonen 8, 9 und 10. Die anderen Exons sind an der Steuerung der gewebespezifischen oder entwicklungsrelevanten Expression beteiligt (Ohlsen et al., 1994; DeChiara et al., 1991). Ein plazentaspezifisches IGF2-Transkript in der Maus wurde von Constancia et al. (2002) beschrieben. Die Transkription beginnt in der Plazenta am Promotor P0, da die Promoter P1–P4 nicht vorhanden sind. Durch In-situ Hybridisierung konnte die mRNA-Expression in Trophoblastzellen der Labyrinth-Zone lokalisiert werden.

Eine besondere Rolle in der Vermittlung von IGF2-Wirkungen spielt der IGF1-R. Zwar gibt es einen IGF2-R, dieser dient jedoch nicht der Induktion von

Signalkaskaden, sondern der Inaktivierung und Eliminierung des Liganden (Kap. 2.2.2.). In Experimenten wurde mit IGF1-, IGF2- und/oder IGF1-R-Knock-out-Mäusen gezeigt, dass IGF2 weitere Rezeptoren nutzt, um einen positiven Wachstumseffekt zu erzeugen (Baker et al., 1993; Ludwig et al., 1996). Einer dieser Rezeptoren ist der Insulin-Rezeptor (InsR) (Morrione et al., 1997; Louvi et al., 1997). Der InsR ist bei der Maus für etwa 40% der IGF2-Aktivität im Geburtszeitraum verantwortlich (Louvi et al., 1997).

Störungen der IGF2-Expression spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener pathologischer Prozesse, z.B. des *Beckwith-Wiedemann Syndroms*, des somatischen Überwuchses, des *sporadischen Wilms' Tumors* und anderer Tumoren (LeRoith et al., 1995; Eggenschwiler et al., 1997; Sun et al., 1997; O'Dell und Day, 1998). Hepatozelluläre Karzinomzellen des Menschen weisen eine Kolo-kalisation von IGF2 und dem Proliferationsmarker Ki-67 auf (Sohda et al., 1997).

2.2.2. Rezeptoren des IGF-Systems

Der IGF1-Rezeptor (IGF1-R) und der IGF2-R sind strukturell und funktionell sehr unterschiedliche Rezeptoren.

Der IGF1-R gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren und ist strukturell dem Insulin-Rezeptor (InsR) stark verwandt. Eine 70%ige Homologie zum InsR ist bei Mensch, Maus und Ratte vorhanden. Der IGF1-R besteht aus 2 α -Untereinheiten mit je 130 kDa und 2 β -Untereinheiten mit je 90 kDa und besitzt demnach eine Hetero-Tetramer-Struktur (Kiess et al., 1988; Baker et al., 1993; De Meyts et al., 1994; LeRoith et al., 1995; Han und Carter, 2000).

IGF1-R bindet mit ähnlicher Affinität IGF1 und IGF2 (Germain-Lee et al., 1992; Baker et al., 1993), mit einer niedrigeren auch Insulin (Baker et al., 1993). Durch Autophosphorylierung des Rezeptors und Phosphorylierung weiterer Substrate werden nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung fördern (Schlessinger und Ullrich, 1992). IGF1-R-Knock-out-Mäuse zeigten ein reduziertes praenatales Wachstum (Liu et al., 1993; Baker et al., 1993), welches mit einer Muskelhypoplasie und einer verzögerten Ossifikation einhergeht (Liu et al., 1993). Ein weiterer Ligand, der am COOH-Terminus des IGF1-R binden kann, ist Growth Factor Receptor bound Protein-10 (Grb10; Morrino et al.,

1996). Grb10 ist ein „imprinted gene“ (Lim et al., 2004), das eine negativ regulierende Wirkung auf das Insulin-System hat (Wang et al., 2007). In unterschiedlichen Studien führten Über- oder Unterexpression des Grb10-Gens zu einer Wachstumsverzögerung (Shirura et al., 2005) bzw. einem somatischen Überwuchs (Charalambous et al., 2003).

IGF2-R besitzt keine Tyrosinkinaseaktivität. Dieser Rezeptor ist ein Monomer und etwa 250 – 300 kDa schwer (Kiess et al., 1988; Han und Carter, 2000; Olson et al., 2002). An einer anderen als der IGF2-Bindungsstelle bindet dieser Rezeptor Mannose-6-Phosphat, so dass er auch als kationenunabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Man6P-R) bezeichnet wird (Kiess et al., 1988). IGF2-R/Man6P-R gehört wie der kationenabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zur Phosphatlectin-Familie und ist ein Typ I Membran-Glykoprotein (Olson et al., 2002). Zu 90-95% ist der IGF2-R/Man6P-R im intrazellulären Kompartiment lokalisiert, vornehmlich am Trans-Golgi-Netzwerk und am Endosom. Nur 5-10% befinden sich an der Zelloberfläche (Kornfeld, 1992). Die Bindungsaktivität des IGF2-R/Man6P-R wird durch Retinolsäure gefördert, die ebenfalls an diesem Rezeptor binden kann und einen regulierenden Einfluss auf den Rezeptor hat (Kang et al., 1998).

IGF2-R bindet mit sehr hoher Affinität IGF2, seine Bindungsfähigkeit für IGF1 ist um das 100fache geringer (Baker et al., 1993). Die Funktion des IGF2-R ist in erster Linie die Reinigung des Plasmas und der Gewebeflüssigkeit von IGF2 (Lau et al., 1994), hierdurch wird ein Überangebot von IGF2 verhindert (Nissley et al., 1991). IGF2-R transportiert den Liganden zum praelysosomalen Kompartiment. Die Rezeptor-Liganden-Bindung wird dort durch den niedrigeren pH-Wert aufgehoben (Kornfeld, 1992), der Ligand wird im Lysosom ohne Signalkaskadeninduktion degradiert und IGF2-R wandert zur Zellmembran zurück (Kiess et al., 1988, Kang et al., 1998; Kornfeld, 1992). Eine IGF2-R-Nullmutation führt zu einem hohen Geburtsgewicht, kombiniert mit erhöhter Letalität (Lau et al., 1994). Der IGF2-R hat eine bedeutende Rolle in der Zellwachstums-Regulierung während der fetalen Entwicklung (Lau et al., 1994; Ludwig et al., 1996). Bei Mäusen mit reduzierter IGF2-R-Expression wurde eine vierfach höhere IGF2-Konzentration im Serum gemessen als beim Wildtyp (Ludwig et al., 1996). Young et al. (2001) fanden bei in vitro produzierten bzw. geklonten Schaffeten typische Merkmale einer IGF2-Überexpression wie Organomegalie und erhöhte Totgeburtenraten. Die IGF2-

Konzentrationen im fetalen Blut waren gegenüber Feten aus normalen Graviditäten tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Autoren sahen hier einen Zusammenhang mit der gleichfalls festgestellten reduzierten IGF2-R-mRNA-Expression.

2.2.3. Bindungsproteine des IGF-Systems

Durch die IGF-Bindungsproteine (IGFBP) wird die biologische Verfügbarkeit von IGF1 und IGF2 reguliert. Nach Clemmons (1997) gibt es sechs unterschiedliche IGFBP. Oh et al. (1996) charakterisierten zusätzlich IGFBP-7, welches auch IGFBP related Protein (IGFBPrP)-1 genannt wird, da es eine geringere Affinität für IGF1 und IGF2 hat (Hwa et al., 1999), jedoch eine hohe Affinität für Insulin (Yamanaka et al., 1997). Kim et al. (1997) beschrieben noch weitere Proteine, die eine schwächere Affinität zu den IGFs aufweisen, und die von ihnen als IGFBP-8 bis -10 benannt werden. Die Größe der Bindungsproteine schwankt zwischen 24 und 36 kDa, nur IGFBP-3 ist mit 150 kDa bedeutend schwerer als die anderen (Han und Carter, 2000). Die IGFBP besitzen eine hoch konservierte N- und C-terminale Domäne und variieren in der mittleren Region (Domäne L). N- und C-Domäne weisen einen hohen Cytosin-Gehalt auf, wohingegen die L-Domäne relativ wenige Cytosinreste besitzt (Hwa et al., 1999). Die IGFBP-1, -3 und -4 binden IGF1 und IGF2 mit gleicher Affinität, wohingegen IGFBP-2, -5 und -6 hauptsächlich IGF2 binden (Reynolds et al., 1997).

Binden sich die IGFs an die IGFBP, können die Liganden in ihrer Wirkung gehemmt oder gefördert werden (Wood, 1995). Durch die Bindung ist die Halbwertszeit der Liganden von etwa 10 auf 20 bis 30 Minuten gesteigert (Guler et al., 1989). IGFBP in Lösung haben eine deutlich größere Bindungsaffinität für die Liganden als der IGF1-R (Wood, 1995). Eine Assoziation der IGFBP zur extrazellulären Matrix oder zur Zelloberfläche reduziert die Bindungsvorliebe von IGF1 und IGF2 auf ein ähnliches Niveau wie für die Rezeptoren (Wood, 1995). So können IGFBP zu einer Aktivitätssteigerung der IGF-Liganden führen, indem sie einen lokalen Pool für die Rezeptoren erreichbar halten. Experimente mit genetisch modifizierten Mäusezelllinien zeigten in vivo nach physiologischer, partieller oder vermehrter Expression von IGFBP-Genen, dass IGFBP effektiv Änderungen in anderen Bereichen des IGF-Systems ausgleichen können (Wood, 1995). Neben der Expression von Liganden, Rezeptoren und Bindungsproteinen gibt es offensichtlich

weitere Mechanismen, über welche die Aktivitäten des IGF-Systems lokal reguliert oder moduliert werden können. Die Bindungsfähigkeit der Bindungsproteine für IGF1 und IGF2 kann durch unterschiedliche Proteasen komplett oder teilweise reduziert werden (Wetterau et al., 1999). Davenport et al. (1992) berichten, dass im Serum schwangerer Frauen oder tragender Ratten eine Protease enthalten ist, die aus der Plazenta stammt und IGFBP-3 spaltet. Eine Protease, die auch IGFBP-4 spaltet, ist nach Lawrence et al. (1999) das Pregnancy-associated Plasma Protein A, welches in der menschlichen Plazenta produziert wird (Westergaard et al., 1983). Glykosylierungs- oder Phosphorylierungsvorgänge können die IGF-Affinität zu den Bindungsproteinen ebenfalls ändern, so detektieren Jones et al. (1991) eine sechsfach höhere Affinität von IGF1 zum IGFBP-1 nach dessen Phosphorylierung. Die Affinitätsänderungen nach Glykosylierung-, Phosphorylierung oder Proteolyse bieten eine Erklärung für die zum Teil unterschiedlichen Angaben in der Literatur zur Bindungsvorliebe der IGFBP gegenüber IGF1 bzw. IGF2.

Bei Nagern, Unpaarzehlern, Menschen und Affen sind im fetalen Gewebe und Serum hauptsächlich IGFBP-1 bis -4 zu finden (Donovan et al., 1989; Lee et al., 1993; Carr et al., 1995; Kind et al., 1995; Tarantal und Gargosky, 1995; Osorio et al., 1996). Die Expression ist gewebespezifisch und von dem embryonalen bzw. fetalen Entwicklungsstadium abhängig (Donovan et al., 1989; Lee et al., 1993; Carr et al., 1995; Tarantal und Gargosky, 1995).

IUGR-Feten bei Meerschweinchen haben eine höhere Konzentration von IGFBP-2 und -4 im Plasma bei reduzierten IGFBP-3-Spiegeln (Carter et al., 2005). Untersuchungen der mRNA-Konzentrationen zeigten eine signifikant höhere Expression der IGFBP-2-mRNA in der Leber von IUGR-Feten, gekoppelt mit einer geringeren IGFBP-3-Expression (Carter et al., 2005). Einen kausalen Zusammenhang zwischen der IGFBP-2 und -3-Expression beschrieben die Autoren nicht. Bei Schafen und Menschen liegt eine positive Korrelation zwischen der IGFBP-3-Konzentration und dem Geburtsgewicht vor (Kind et al., 1994; Carr et al., 1995), wohingegen genetisch modifizierte Mäuse, die eine Überexpression von IGFBP-1 und -3 zeigen, eine prae- und postnatale Wachstumsretardation haben (Modric et al., 2001; Silha und Murphy, 2002). Für IGFBP-2 (Hoeflich et al., 1999) und IGFBP-5 (Salih et al., 2004) führt eine Überexpression zu einem reduzierten Geburtsgewicht und einer schlechteren Muskeldifferenzierung.

Die Amnionflüssigkeiten normal großer Meerschweinchenfeten weisen deutlich niedrigere IGFBP-Konzentrationen auf als solche von Feten mit einer Wachstumsretardation (Carter et al., 2005). Geisert et al. (2001) untersuchten an frühtragenden Sauen die Rolle von Matrix-Metalloproteinasen für die Proteolyse von IGFBP. Die Konzentrationen von IGFBP-2 und -3 in der Uterusflüssigkeit wird durch diese Enzymwirkung reduziert und umgekehrt die von IGF1 und IGF2 gesteigert, was die embryonale Entwicklung stimuliert. Bilby et al. (2004) zeigen in ihren Experimenten, dass IGFBP-3 bei nichttragenden Rindern im Uteruslumen signifikant höher exprimiert ist als bei frühtragenden Tieren.

In späten Trächtigkeitsphasen ist die IGFBP-Expression im Uterus speziesübergreifend beeinflusst durch die Ernährungssituation und den Hormonstatus des Muttertiers. Diese Faktoren haben in dieser Zeit einen höheren Einfluss auf die Expression von IGFBP-1, -2 und -4 und einen geringeren auf IGFBP-3. Eine Nährstoffunterversorgung des Fetus resultiert in einer Steigerung der fetalen IGFBP-1-Konzentration (Straus et al., 1991; Fowden, 2003), umgekehrt führt eine erhöhte Glukosekonzentration zu einer IGFBP-1-Reduktion (Osborn et al., 1992). Eine erhöhte IGFBP-1-Konzentration findet sich auch bei hypoxischen Schaffeten (Iwamoto et al., 1992), dieses bestätigt ebenfalls Chard (1994) in humanmedizinischen Studien an Neugeborenen.

Im Serum adulter Rinder sind ca. 95% von IGF1 und IGF2 an IGFBP-3 gebunden, welches damit das wichtigste Bindungsprotein ist (Reynolds et al., 1997).

Neben der Bindung von IGF1 und IGF2 können IGFBPs weitere, IGF-unabhängige Funktionen besitzen, dieses bedeutet ein Wirkungseintritt ohne Beteiligung der IGF-Liganden oder Rezeptoren. IGFBP-1 kann über die RGD-Domäne (bestehend aus Arginin-Glycin-Asparginsäure) mit $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin interagieren (Jones et al., 1995) und dadurch die Zellproliferation beeinflussen (Irving und Lala, 1995). Eine erhöhte Expression von IGFBP-1 führt zu reduzierten Körper- und Organgewichten in transgenen Mäusen, da die Zellproliferation gehemmt wird (D'Ercole et al., 1994; Gay et al., 1997).

Eine gesteigerte Expression von IGFBP-2 findet man vor allem in Tumorzellen. Durch IGFBP-2 werden Gene exprimiert, die die Tumorzellinvasion steigern (Wang et al., 2003). Eine vermehrte Expression von IGFBP-2 führt zu einem verminderten Körpergewicht (Hoeftlich et al., 1999), wie bei IGFBP-1 kommt es über

die RGD-Domäne zu einer Interaktion mit $\alpha 5$ -Integrin (Wang et al., 2006). IGFBP-2 hat einen negativen Effekt auf das Knochenwachstum (Eckstein et al., 2002).

Der Transforming Growth Factor beta (TGF- β)-Rezeptor ist auch ein spezifischer Rezeptor für IGFBP-3 (Bushman und Kuemmerle, 1998; Leal et al., 1999), -4 (Durham et al., 1994) und -5 (Bushman und Kuemmerle, 1998). Alle drei IGFBPs haben einen Einfluss auf die Apoptoserate. IGFBP-3 fördert und induziert über einen IGF-unabhängigen Mechanismus die Apoptose, wohingegen IGFBP-4 und -5 hemmend auf diesen Prozess einwirken (Perks et al., 2003). Eine Überexpression von IGFBP-4 führt zu einem reduzierten Gewicht mit einem gestörten Knochenwachstum (Zhang et al., 2003). Gestörte Knochenmineralisierung und Muskelausbildung mit reduziertem Körpergewicht und gesteigerter perinataler Mortalität können auf eine Überexpression von IGFBP-5 zurückgeführt werden (Devlin et al. 2002; Salih et al., 2004).

In die Gruppe der Bindungsproteine gehören auch die Insulin-like Growth Factor Binding Proteins related Proteins (IGFBPrP), die erstmals von Kim et al. (1997) beschrieben wurden. Sie weisen eine strukturelle Homologie zu einer Domäne der Bindungsproteine auf, haben aber eine reduzierte Bindungsaffinität für die IGFs. Sie binden im Gegensatz zu den IGFBP auch Insulin und können wie die IGFBP IGF-unabhängig aktiv sein. Zurzeit gibt es zehn bekannte IGFBPrP (Hwa et al., 1999). Über deren Expression und eventuelle Funktion in der Plazenta liegen derzeit keine Informationen vor (Han und Carter, 2000).

2.3. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen an Fetus und Plazenta beim Rind

Anmerkung: Die hier in der vorliegenden Arbeit gemachten Angaben beziehen sich auf das Rind. Andere angesprochene Spezies werden in dem jeweiligen Zusammenhang ausdrücklich erwähnt.

2.3.1. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen am Fetus: Large Offspring Syndrome (LOS) und Abnormal Offspring Syndrome (AOS)

Kultivierung und Manipulation von Embryonen sind assoziiert mit gehäuftem Auftreten von Entwicklungsabnormalitäten bei den resultierenden Feten und neugeborenen Kälbern (Willadsen et al., 1991; Keefer et al., 1994; Wilson et al., 1995; Farin und Farin, 1995; Farin et al., 2006). Unter dem breiten Spektrum der auftretenden Anomalitäten wurde gehäuft ein ausgeprägter fetaler Überwuchs beobachtet, so dass dieser Phänotyp als „Large Offspring Syndrome“ (LOS) oder als „Large Calf Syndrome“ bezeichnet wurde. Beide Begriffe werden synonym verwendet (Walker et al., 1996; Young et al., 1998). Bei Embryonen aus dem somatischen Nukleustransfer (somatic cell nuclear transfer, SCNT) ist die Auftrittswahrscheinlichkeit und Ausprägung fetaler bzw. neonatler Anomalien bedeutend größer, als bei in vitro-produzierten (IVP) Embryonen (Willadsen et al., 1991; Keefer et al., 1994; Wilson et al., 1995; Farin und Farin, 1995; Sinclair et al., 1995; Walker et al., 1996). Das „Large Offspring Syndrome“ bzw. Biotechnologie-assoziierte Aberrationen wurde auch bei Schafen (Walker et al., 1992 und 1996, Young et al., 1998; Bertolini et al., 2001), Mäusen, Ratten (Fernandez-Gonzalez, 2004) und Menschen (Wrenzycki et al., 2004) beobachtet, wobei beim Menschen eher eine fetale Wachstumsrestriktion als ein Überwuchs auftritt (Abu-Amero et al., 1988).

Teilweise wurde bei den LOS-Trächtigkeiten eine Verlängerung der Graviditätsdauer beobachtet (Walker et al., 1992; Constant et al., 2006), diese ist jedoch nicht der alleinige Grund für den fetalen Überwuchs, der sich bereits relativ früh während der Fetalphase manifestiert (Hiendleder et al., 2004a, 2004b, 2004c).

Kälber aus LOS-Trächtigkeiten haben ein gesteigertes Geburtsgewicht (Walker et al., 1992; Wilson et al., 1995; Constant et al., 2006), in der Literatur findet man Angaben zwischen 44–58,6 kg (Hill et al., 1999) und bis zu 82,6 kg (Wilson et al., 1995). Wilson et al. (1995) verglichen Geburtsgewichte von Kälbern getrennt nach Geschlecht aus SCNT (n = 418), konventionellen Embryotransfer (MOET, n = 4687) und künstlicher Besamung (AI, n = 8925). Hauptsächlich handelte es sich um Kälber der Fleischrassen Angus, Brangus und Simbrah. Geburtsgewichte der Kälber aus MOET (männlich = $39,3 \pm 7,2$ kg/weiblich $37,1 \pm 5,9$ kg) und aus AI ($36,8 \pm 6,2$ kg/ $34,6 \pm 5,4$ kg) lagen deutlich unter denen durch SCNT erzeugter Neonaten ($49,5 \pm 10,5$ kg/ $47,5 \pm 10,5$ kg). Die SCNT-Kälber waren um ca. 25% schwerer als die MOET-Kälber, welche wiederum um ca. 8% schwerer waren als die AI-Kälber. Ein überhöhtes Gewicht von Kälbern aus SCNT zum Zeitpunkt der Geburt wurde auch von anderen Autoren bestätigt (Chavatte-Palmer et al., 2002; Heyman et al., 2002; Miles et al., 2004). Bertolini et al. (2002) fanden ein signifikant höheres Geburtsgewicht auch bei IVP-Kälbern ($43,2 \pm 7,4$ kg) im Verhältnis zu den Kontrollfeten aus AI ($32,5 \pm 5,1$ kg), entsprechendes gilt für die Scheitel-Steiß-Länge ($94,8 \pm 3,8$ cm/ $81,8 \pm 6,6$ cm). Demnach können auch die Bedingungen, denen Embryonen bei der IVP ausgesetzt sind, zu einem fetalen Überwuchs führen (Young et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Bertolini und Anderson 2002; Bertolini et al., 2002, 2004; Lazzari et al., 2002; Hiendleder et al., 2004a, 2004b, 2004c, 2006).

Kälber mit LOS können multiple Organdefekte aufweisen (Maxfield et al., 1997; Young et al., 1998). Hill et al. (1999) beschrieben dilatative Kardiomyopathien des linken Herzens verbunden mit einer Tachykardie und venösem Bluthochdruck. Auch Defizite des Surfactant-Faktors in der Lunge und pulmonale Hypertonie wurden beschrieben (Hill et al., 1999). Bei geklonten Lämmern fanden sich Ödembildung am ganzen Körper und Hydronephrosen (Wells et al., 1998). Bei Kälbern aus SCNT wurden ebenfalls unproportional übergroße Nieren beschrieben (Chavatte-Palmer et al., 2002; Heyman et al., 2002). Zahlreiche LOS-Kälber wiesen einen vergrößerten, ödematösen Hautnabel auf (Hill et al., 1999, Miglino et al., 2007).

Weiterhin wurden bei den neugeborenen Kälber im Zusammenhang mit dem LOS klinisch-chemisch eine Hypoglykämie, metabolische Azidose (Garry et al., 1996) sowie eine Hypoxie und pulmonale Hypertonie beobachtet (Garry et al., 1996; Hill et al., 1999), die Hill et al. (1999) pathogenetisch auf eine Lungenunterentwicklung zurückführen konnten. Die Lungen zeigten ein Defizit im

Surfactant-Faktor. Sie beobachteten ferner das Auftreten des NRDS (Neonatal Respiratory Distress Syndrome, Neonatales Atemnot Syndrom). In einigen Fällen konnte auch eine Hypothermie diagnostiziert werden (Garry et al., 1996), wohingegen Chavatte-Palmer et al. (2002) eine Hyperthermie bis zu 41°C ohne weitere klinische Symptomatik fanden.

Walker et al. (1992) und Garry et al. (1996) beobachteten eine Trinkschwäche der Kälber und andere postnatale Störungen, wie Hypothermie und neonatale Lebensschwäche, welche von Hill et al. (1999) bestätigt wurden.

In der Adaptationsphase findet man bei LOS-Kälbern eine signifikant höhere neonatale Sterblichkeit (Walker et al., 1992), die häufig durch eine Sepsis (Garry et al., 1996) oder durch eine Bronchopneumonie (Garry et al., 1996; Hill et al., 1999) bedingt ist. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Aufzucht von SCNT-Kälbern ist deutlich verringert und beträgt nur 50-70% (Heyman et al., 2004)

Der Phänotyp im Alter von einem Jahr zeigt zwar immer noch signifikante Größenunterschiede zwischen den aus SCNT-stammenden Rindern (männlich = 519,0±52,3 kg/weiblich 429±44,1 kg) im Vergleich zu Tieren, die mittels MOET (männlich = 497,4±56,7 kg/weiblich 356,3±39,3 kg) bzw. durch AI (männlich = 497,0±50,6 kg/weiblich 352,9±35,2 kg) produziert wurden. Der relative Größenunterschied zwischen SCNT- und MOET- bzw. AI-Kälbern reduziert sich jedoch von ca. 20% zum Zeitpunkt der Geburt auf 5% im Alter von einem Jahr und auch die Variabilität des Körpergewichtes verringert sich deutlich (Wilson et al., 1995). Die täglichen Zunahmen zeigen nach der Geburt keine Gruppenunterschiede mehr (Heyman et al., 2004). Hieraus kann geschlossen werden, dass sich das Körpergewicht von LOS-Kälbern mit zunehmendem Alter dem von normalgewichtigen Kälbern angleicht.

SCNT- und IVP-Embryonen können sich in der Trächtigkeit physiologisch zu gesunden Kälbern entwickeln, durch embryonalen Fruchttod/Abort absterben oder im weiteren Verlauf der fetalen Entwicklung verschiedene Defekte in unterschiedlicher Ausprägung aufweisen (Kruip et al., 1997; Chavatte-Palmer et al., 2002). Diese unterschiedlichen phänotypischen Variationen unter dem Begriff „Large Offspring Syndrome“ zu vereinigen halten Farin et al. (2001) und Chavatte-Palmer et al. (2002) für nicht sinnvoll, zumal der fetale Überwuchs als Leitsymptom in vielen Fällen von Biotechnologie-assoziierten Abnormalitäten fehlt. Wegen dieser Heterogenität des

Phänotyps empfehlen Farin et al. (2006) das „Large Offspring Syndrome“ als „Abnormal Offspring Syndrome“ (AOS) zu bezeichnen. Das von ihnen entwickelte Klassifizierungsschema ermöglicht es, die nach IVP oder SCNT auftretenden Abnormalitäten nach Schweregrad und Effektivität der Kompensationsmechanismen einzuteilen.

Sie definieren dabei vier unterschiedliche Typen (Abb. 2.3) des „Abnormal Offspring Syndrome“.

Dabei zeigt **Typ I AOS** eine abnormale Entwicklung bereits in der frühen Embryogenese vor Abschluss der Organentwicklung, dieses führt zum frühen embryonalen Tod bis zum 42. Tag der Trächtigkeit bei Rindern.

Auch Stice et al. (1996) beschrieben eine gesteigerte Inzidenz von Aborten bei geklonten Kälbern bis zum 40. Tag der Trächtigkeit.

Typ II AOS führt zum fetalen Tod/Abort zwischen der abgeschlossenen Organogenese (> 42. Tag) und dem physiologischen Geburtszeitpunkt (ca. 280.-290. Tag). Ursache hierfür ist eine unphysiologische Entwicklung der Plazenta und/oder des Fetus.

Entsprechend findet man bei SCNT-Graviditäten eine erhöhte Rate von Aborten mit zahlreichen fetalen Veränderungen, z.B. einer Nabelverdickung um das zweifache, Anasarca oder kardio-pulmonale Aberrationen an den Feten (Hill et al., 1999; Chavatte-Palmer et al., 2002). Bei SCNT-Trächtigkeiten von Schafen wurde ab dem 30. Tag eine erhöhte Fetenverlustrate mit pathologischen Veränderungen an den Nierenbecken der Feten beobachtet (Loi et al., 2006). Eine gesteigerte Herzfrequenz konnte bei Rinderfeten aus IVP zwischen dem 44. und 93. Trächtigkeitstag im Vergleich zu in vivo erzeugten Feten dargestellt werden (Bertolini et al., 2002). Hill et al. (2000) beobachteten, dass über 80% der geklonten Feten zwischen dem 30. und 90. Trächtigkeitstag abstarben. Bei IVP und AI Trächtigkeiten wurden im entsprechenden Zeitraum keine gesteigerten embryonalen Verluste gefunden. Bei den von Hill et al. (2000) untersuchten Aborten waren die Plazenten gehäuft rudimentär angelegt und unphysiologisch entwickelt, mit schlechter Vaskularisierung, marginaler Entwicklung der Chorioallantois und reduzierter Kotyledonenanzahl. In dieser Trächtigkeitsphase spielen Plazentaanomalien gegen über Entwicklungsaberrationen des eigentlichen Fetus die bedeutendere Rolle als Abortursache (Hill et al., 2000).

| | | Kategorie | Kompensation in der Trächtigkeit | Geburt |
|---------------|---|--|-------------------------------------|--|
| IVP / SCNT | → | normale Entwicklung | | normale Kälber |
| | → | Typ I AOS <i>embryonale oder fetale Fehlentwicklung</i> | nicht effektiv | frühembryonaler Fruchttod, Abort |
| | → | Typ II AOS <i>Fehlentwicklung der Fruchthüllen und des Fetus</i> | nicht effektiv | fetaler Fruchttod, Abort |
| LOS | → | Typ III AOS <i>starke Veränderungen an Plazenta und Fetus</i> | nicht effektiv | Kälber mit starken Abnormalitäten (peripartaler Tod) |
| | → | Typ IV AOS <i>schwache Veränderungen an Plazenta und Fetus</i> | effektiv | normal oder abnormale Größe der Neonaten, mit oder ohne weiteren Abnormalitäten, i.d.R. lebend (oft neonataler Tod) |

Abb. 2.3: Klassifizierungssystem für die Entwicklung von Embryonen nach in vitro-Produktion (IVP) oder somatischem Nukleustransfer (SCNT) bei Rindern; AOS = Abnormal Offspring Syndrome; LOS kennzeichnet nach dieser Klassifizierung die AOS-Typen, welche mit einem fetalen Überwuchs einhergehen (modifiziert nach Farin et al., 2006)

Einen geburtsreifen Fetus und/oder Plazenta mit schwerwiegenden Entwicklungsanomalien ohne ausreichende kompensatorische Möglichkeit durch Fetus und/oder Plazenta bezeichnen Farin et al. (2006) als **Typ III AOS**. Die Geburt kann physiologisch oder gestört verlaufen. Das Kalb zeigt veränderte klinische, hämatologische oder biochemische Parameter und verstirbt im geburtsnahen Zeitraum oder innerhalb der neonatalen Periode mit morphologischen Abweichungen des Phänotyps.

Beim **Typ IV AOS** treten nur sehr schwache Veränderungen an der Plazenta und/oder dem Kalb auf, welche kompensiert werden können. Die Größe des Neonaten ist rassetypisch oder gesteigert, teilweise kann es zu einer Dystokie kommen. Zum Zeitpunkt der Geburt können die klinischen, hämatologischen oder biochemischen Parameter des Neonaten verändert sein.

Obwohl der Begriff AOS insgesamt dem Phänomen der Biotechnologie-assoziierten Alterationen eher gerecht wird als andere Bezeichnungen und durch die Klassifizierung verschiedener Typen eine plausible Differenzierung der

verschiedenen Phänotypen unter Berücksichtigung ihrer mutmaßlichen Pathogenese vorgenommen wird, hat sich die von Farin et al. (2006) vorgeschlagene Nomenklatur bisher nicht allgemein durchgesetzt.

2.3.2. Biotechnologie-assoziierte Veränderungen an der Plazenta: Large Placenta Syndrome (LPS)

Constant et al. (2006) verglichen mittels SCNT-erzeugten Graviditäten, bei denen eine Hydrallantois auftrat, mit Graviditäten aus künstlicher Besamung im 3. Trimester der Trächtigkeit. Gemessen zum Zeitpunkt der Geburt wurden die Parameter Plazentomanzahl, durchschnittliches Plazentomgewicht, Gesamt-plazentomgewicht und Fetengewicht. Zusätzlich wurden im Verlauf der SCNT-Gravidität in regelmäßigen Abständen ultrasonografische Untersuchungen durchgeführt und hierbei auf die Dicke der Plazentome und das Vorliegen einer klinisch-relevanten Hydrallantois geachtet. Größenzunahme und Aberrationen der Plazenta waren bereits vor den Veränderungen im Bereich des eigentlichen Fetus zu erkennen. Constant et al. (2006) vermuteten daher, dass die fetalen Alterationen zumindest teilweise ihren Ursprung in Plazentaveränderungen haben, und empfahlen deswegen das LOS in „Large Placenta Syndrome“ (LPS) umzubenennen. Schon früher beobachteten Bertolini und Anderson (2002) einen Zusammenhang zwischen Plazentaaberrationen und einem fetalen Überwuchs. Auch bei Lämmern aus SCNT werden die Veränderungen der Plazenta als die Hauptursache für eine erhöhte Sterblichkeit diskutiert (Loi et al., 2006).

Das LPS findet sich bei SCNT- und IVP-Graviditäten in unterschiedlicher Ausprägung und zeigt damit eine Abhängigkeit von der Art der Biotechnologie-Methode. Hill et al. (2000) beobachteten schon im ersten Trimester vermehrt signifikante Aberrationen in der Plazenta von SCNT- im Vergleich zu Kontroll-Trächtigkeiten. Alterationen in den Plazentomen aus IVP-Graviditäten fanden Bertolini und Anderson (2002) und Bertolini et al. (2002, 2004) allerdings erst in fortgeschrittenen Graviditäten und in deutlich schwächerer Form als bei Hill et al. (2000) in SCNT-Plazentomen beschrieben. Im Gegensatz dazu fanden Hill et al. (2000), Chavatte-Palmer et al. (2002) und Constant et al. (2006) kein LPS bei IVP-Graviditäten, sie wurden zusammen mit Plazentomen aus AI-Graviditäten als

Kontrollgruppen verwendet. Dieses zeigt eine stark variierende Ausprägung offensichtlich in Abhängigkeit vom IVP-Protokoll.

Bei SCNT-Graviditäten beobachteten Hill et al. (2000) schon im ersten Trimester mittels Ultraschografie und nach Schlachtung der Trägartiere Alterationen an den Plazentomen. Sie fanden ein breites Spektrum von Veränderungen, welches sich von einer Hypoplasie der Chorioallantois über eine reduzierte Anzahl kaum sichtbarer Kotyledonen bis hin zu normal ausgeprägter Plazentaentwicklung erstreckte, wobei diese allerdings nur in einem geringen Anteil der Fälle auftrat. Sie teilten die Plazenten nach dem Schweregrad der Aberrationen in drei Typen ein und stellten Beziehungen zum Zeitpunkt des fetalen Todes her:

In der ersten Gruppe fanden sich hochgradige Störungen in der Entwicklung des Chorions und des Gefäßsystems. Die zugehörigen Feten starben bereits vor dem 45. Graviditätstag. Feten der zweiten Gruppe wiesen einen besser entwickelten Trophoblasten auf, starben jedoch in der folgenden Phase aufgrund unzureichender Ausbildung funktioneller Plazentome ab. Makroskopisch war die embryo-maternale Kontaktfläche in dieser Gruppe verkleinert, bei lichtmikroskopischen Untersuchungen der Plazentome fanden sich ein in der Höhe reduzierter Trophoblast und eine schlechtere Vaskularisierung. Nur die Feten, welche in der Lage waren, funktionelle Plazentome in ausreichender Anzahl auszubilden (Gruppe 3), konnten ihre Entwicklung über das erste Trimester hinaus fortsetzen. Aus ihren Ergebnissen schlossen Hill et al. (2000), dass Störungen der Plazentaentwicklung als Ursache der besonders im ersten Trimester auftretenden Verluste von SCNT-Trächtigkeiten eine überragende Rolle spielen.

Ultraschografische Untersuchungen im weiteren Verlauf der Gravidität (Tag 80 bis 240) von Kohan-Ghadr et al. (2008) zeigten, dass zu allen untersuchten Trächtigkeitszeitpunkten die Plazentomdurchmesser der SCNT-Graviditäten signifikant größer waren als bei den Kontrollen aus MOET und AI. Im letzten Trimester der Trächtigkeit zeigten sich die signifikantesten Unterschiede, hier konnte zwischen dem 180. und 240. Tag eine signifikante Größenzunahme der SCNT-Plazentome gefunden werden. In den Kontroll-Plazentomen fand dagegen im gleichen Zeitraum keine signifikante Größenzunahme statt, sondern es wurde eine Abflachung der Plazentom-Wachstumskurve beobachtet.

Wie Hill et al. (1999) beobachtet sind auch am Graviditätsende bzw. unter der Geburt charakteristische Plazenta-Aberrationen zu beobachten. Die Anzahl der Plazentome bei Trächtigkeiten aus SCNT ist signifikant reduziert, dieses fanden Farin und Farin (1995) auch bei IVP-Graviditäten, jedoch ist das Durchschnittsgewicht dieser SCNT-Plazentome signifikant höher als bei den Kontrollplazentomen aus IVP bzw. AI (Chavatte-Palmer et al., 2002; Constant et al., 2006). Dieses bezeichnen Constant et al. (2006) als „*Placentomegaly*“, gleiche Beobachtungen konnten DeSousa et al. (2001) auch bei Schafen beschreiben. Keine signifikanten Unterschiede im Gesamtgewicht der Plazenta ergeben sich jedoch zwischen IVP und AI erzeugten Trächtigkeiten (Bertolini et al., 2002; Constant et al., 2006). Morphologische Veränderungen konnten aber auch an der Plazenta bei IVP-Trächtigkeiten gefunden werden (Bertolini und Anderson, 2002; Bertolini et al., 2002, 2004). Das Plazentomgewicht der IVP-Graviditäten war allerdings nicht höher und die Plazentomoberfläche war nahezu identisch mit den AI-Trächtigkeiten, die als Kontrollen dienten (Bertolini und Anderson, 2002). Bei getrennter Analyse der beiden Uterushörner wurden aber signifikant größere Plazentomdiameter und -oberflächen im fruchttragenden Horn der IVP-Graviditäten zum Zeitpunkt der Geburt gegenüber den Kontrollplazentomen aus AI-Graviditäten gemessen (Bertolini et al., 2002). Die Plazenten von SCNT-Graviditäten zeigen häufig eine Hydrallantois (bis zu 150 l Flüssigkeit in der Chorionallantoisblase) bzw. ein Hydramnion (ungefähr 20 l Flüssigkeit im Amnionsack) mit oder ohne Ödem (Hill et al., 1999, 2001). In Schafplazenten von SCNT-Trächtigkeiten konnte ebenfalls gehäuft eine Hydrallantois diagnostiziert werden, das Volumen der Allantoisflüssigkeit betrug zum Teil das zehnfache des normalen Volumens (Loi et al., 2006). Hasler et al. (1995) und van Wagendonk-de Leeuw et al. (1998, 2000) konnten in ihren Studien an IVP-Graviditäten ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Hydrallantois beobachten und fanden bei den Kälbern LOS-typische Aberrationen. Die Ödembildung (Dicke > 1,0 cm) zeigte sich vor allem im interkotyledonären Bereich der Chorionallantois als auch im Amnion (Hill et al., 1999, 2001; Chavatte-Palmer et al., 2002; Miglino et al., 2007; Kohan-Ghadr et al., 2008). Hill et al. (1999) konnten einen Zusammenhang zwischen dem Plazentaödem und dem Lungenhochdruck der neugeborenen Kälber entdecken. Miglino et al. (2007) beschrieben bei SCNT-Graviditäten Plazentaödeme mit Ödembildung bis in die Nabelwand der Neonaten hinein. Kohan-Ghadr et al. (2008) fanden einen größeren Nabeldurchmesser mit Ödembildung durch

ultrasonografische Untersuchungen schon ab dem 120. Graviditätstag bei SCNT-Feten. Auch bei IVP-Graviditäten ist die Ausbildung von Ödemen in der Plazenta beschrieben, hier ist die Inzidenz allerdings stark variierend (Bertolini und Anderson, 2002). Histologisch ist bei den LPS-Plazentomen der charakteristische Aufbau eines Rinderplazentoms zu erkennen (Constant et al., 2006; Miglino et al., 2007), das Verzweigungsmuster der Zotten in den Krypten ist jedoch verändert (Miglino et al., 2007). Die Zotten und das Chorion der Korylledonen zeigen eine Größenzunahme ohne Anzeichen eines Ödems. Einige der SCNT-Plazentome zeigen eine reduzierte Zelldichte (Constant et al., 2006) und Dilatation der Gefäße (Constant et al., 2006; Miglino et al., 2007). In der Schafplazenta wurde zusätzlich eine reduzierte Vaskularisierung gefunden (De Sousa et al., 2001; Loi et al., 2006), die Hill et al. (2000, 2001) auch schon bei SCNT-Plazentomen von Rindern beschrieben. In der Spätgravidität und unter der Geburt zeigt das Karunkelepithel auch bei SCNT-Trächtigkeiten die physiologische Abflachung (Miglino et al., 2007). In den Plazentomen von SCNT-Kälbern wurden jedoch degenerierte Entzündungszellen, i.d.R. neutrophile Granulozyten, und mononukleäre Zellen gefunden, die in der Kontrollgruppe nicht auftraten (Kohan-Gadr et al., 2008).

Die Anzahl der Retentio secundinarum bei Trägartieren für SCNT-Embryonen ist auffallend hoch und kann bis zu 80% betragen (Hill et al., 1999, 2001). Über die zugrunde liegenden Störungen des Nachgeburtsabgangs liegen bisher keinerlei Informationen vor. Zur Inzidenz der Retentio secundinarum nach IVP-Graviditäten sind in der Literatur keine Angaben zu finden.

2.4. Epigenetik

Das sporadische und nicht reproduzierbare Auftreten von Biotechnologie-assoziierten fetalen Entwicklungsstörungen verhinderte lange das Verständnis der auslösenden Ursachen und der Pathomechanismen. Das LOS trat zunächst vor allem bei Kälbern und Schafen nach IVP auf, was mit den zahlreichen in vitro-Manipulationen an Eizellen und Embryonen in Verbindung gebracht wurde. Beobachtungen zum LOS ließen einen Zusammenhang mit Bestandteilen der unterschiedlichen Kultivierungsmedien, der Ko-Kultivierung der Embryonen mit Granulosazellen, eine Asynchronität zwischen Embryo und Trägartier und damit

verbunden eine zeitbedingte uterine Milieuverschiebung sowie der Exposition von Embryonen gegenüber erhöhten Progesteronkonzentrationen vermuten (Young et al., 1998).

Die genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind derzeit immer noch weitgehend ungeklärt. Die Tatsache, dass LOS-assoziierte Phänotypen nicht vererbt werden, schließt Veränderungen auf genomischer Ebene aus. Es ist jedoch offensichtlich, dass Störungen epigenetischer Mechanismen eine bedeutende Rolle spielen. Dadurch bedingt zeigen sich Expressionsstörungen wachstums- und entwicklungsrelevanter Transkripte während der Embryonalphase. Unter den wachstums- und entwicklungsrelevanten Genen haben vor allem die *imprinted Genes* eine besondere Bedeutung (Pennisi et al., 2001; Ferguson-Smith et al., 2003; Dean et al., 2003; Reik et al., 2003).

Das Säugergenom setzt sich aus einem paternalen und einen maternalen Anteil zusammen. Bei den meisten Genen sind sowohl das vom Vater als auch von der Mutter stammende Allel aktiv, wodurch Defekte eines der beiden Allele kompensiert werden können. Gene, welche dem *genomischen Imprinting* unterliegen, werden dagegen abhängig von der parentalen Herkunft aktiv oder inaktiv vererbt. Diese parentale genomische Prägung steht im Widerspruch zu den Mendel'schen Gesetzen und wird z.B. durch spezifische Methylierungsmuster der DNA generiert. Das genomische Imprinting ist der wichtigste Mechanismus der Epigenetik und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Phänotypausprägung des Individuums. Für einen Zusammenhang zwischen dem LOS und epigenetischen Mechanismen sprach die Beobachtung, das LOS-assoziierte Phänotypen eine gewisse Ähnlichkeit zum Erscheinungsbild in Fällen einer gestörten Expression von *imprinted genes* aufweisen (Pennisi et al., 2001; Ferguson-Smith und Surani, 2001; Ferguson-Smith et al., 2003; Reik et al., 2003), siehe Abschnitt 2.4.3.

2.4.1 Definition und Bedeutung

Die Epigenetik stellt einen Zweig der Entwicklungsbiologie dar, in dem die kausale Interaktion zwischen Genen und ihren Produkten, welche für die phänotypische Ausprägung des Individuums verantwortlich sind, erfasst wird (Waddington, 1959). Epigenetik fasst genregulierende Aktivitäten und Modifikationen zusammen, die keine Veränderung der DNA-Sequenz hervorrufen, sodass sich die Vererbungseinheit über die DNA hinaus auch auf epigenetische Modifikation der

entsprechenden Sequenz erstreckt (Pennisi et al., 2001). Nach Ferguson-Smith et al. (2003) sowie Ferguson-Smith und Surani (2001) werden die homologen Chromosomen oder die genetischen Regionen aus der Parentalgeneration unterschiedlich durch heritable Modifikationen epigenetisch markiert. Diese sind charakteristisch für einzelne epigenetische Zustände und beteiligen sich mit an der Genaktivität.

Die Erzeugung von Nachkommen ist als ein evolutionärer Konflikt zwischen den Genen der maternalen und paternalen Herkunft zu sehen. Haig und Westoby (1989) bezeichnen dieses als „parent-specific gene expression“ (elternspezifische Genexpression). Durch Modifikationen der beiden homologen Chromosomen oder genetischen Abschnitte kommt es zu einer selektiven Aktivierung der Erbanlagen eines Elternteils und zur Inaktivierung des anderen (Ferguson-Smith et al., 2003). Diesen Vorgang bezeichnet man als *genetisches Imprinting*, im Deutschen genomische Prägung. Die betroffenen Gene werden als *imprinted Genes* gezeichnet. Imprintete Gene sind häufig in der fetalen Entwicklung, dem Wachstum, der Plazentafunktion und der postnatalen Vitalität involviert (Ferguson Smith und Surani, 2001; Reik und Walter, 2001; Reik et al., 2003). Die Unterscheidung von paternalem oder maternalem Allel ist für die frühen embryonalen Stadien von großer Entwicklungsrelevanz. Die paternal exprimierten Gene fördern die Entwicklung und das Wachstum des Fetus, wohingegen die maternalen das Wachstum hemmen (Moore und Haig, 1991; Haig, 1997). Als Beispiel sei hier IGF2 (DiChiara et al., 1991) und IGF2-R (Haig und Graham, 1991) genannt. Die Expression des väterlichen IGF2-Allels fördert das fetale Wachstum (Haig, 2004). Diese genetische Konfliktsituation äußert sich darin, dass das Vatertier eine möglichst kräftige Entwicklung seiner Nachkommen erzielen, das Muttertier hingegen die eigenen Ressourcen für Etablierungen weiterer Graviditäten sichern möchte (Moore und Haig, 1991; Reik et al., 2003; Constancia et al., 2004). Weiterhin wurde postuliert, dass in frühen embryonalen Entwicklungsstadien die Entwicklung des extra-embryonalen Kompartiments zur Plazenta von paternalen Genen gefördert wird, während für das Wachstum des eigentlichen Embryos maternale Gene eine besondere Rolle spielen (Ferguson-Smith et al., 2003). Dafür sprechen auch Befunde aus Untersuchungen an gyno- und androgenetischen Embryonen (Barton et al., 1984; McGrath und Solter, 1984). Zum Verständnis des genetischen Imprinting wurden maternale und paternale Mäuse-Zelllinien entwickelt, die mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen

genetisch identisch sind. Hatada und Mukai (1995) wollten damit herausfinden, wie die Zellen die genetischen Sequenzen väterlicher bzw. mütterlicher Herkunft der Allele unterschiedlich nutzen, um die Funktionsweise der Epigenetik zu verdeutlichen. Sie konnten mehrere Gene identifizieren, die epigenetischen Modifikationen unterliegen, so wurde das IGF2-Gen als eines der ersten imprinteten Gene entdeckt (DiChiara et al., 1991). Andere Untersuchungen zeigten auch, dass nicht-kodierende RNA oder antisense-Transkripte bei der epigenetischen Gen-Regulierung eine wichtige Rolle spielen (Sleutels et al., 2002), wie z.B. Air (Antisense-IGF2-R-RNA).

Beim Menschen sind zwei neurale Dysfunktionen mit völlig unterschiedlichen Krankheitsbildern bekannt. Zum einen das *Prader-Willi Syndrome* (PWS) mit einer starken Verfettung des Organismus durch ungezügelte, zentral gesteuerte Nahrungsaufnahme und zum anderen immer heitere Patienten, die am *Angelman Syndrome* (AS) leiden. Beiden gemeinsam ist die Veränderung an der gleichen 3-4 Mb großen imprinteten Domäne am human Locus 7 des Chromosom 15 (15p7). Patienten, die am PWS erkrankt sind, haben eine fehlende Expression im paternalen Allel, im Gegensatz dazu findet man einen Expressionsverlust im maternalen Allel dieser Domäne bei AS-Patienten (Shemer et al., 2000; Nicholls und Knepper, 2001; Ferguson-Smith et al., 2003). Die Pathogenese von AS bzw. PWS unterstreichen damit sehr eindrucksvoll die Bedeutung der Epigenetik und der parentalen Herkunft der Allele.

2.4.2. Epigenetische Reprogrammierung des Genoms

Während das Genom einer vollständigen Heritabilität unterliegt, ist das Epigenom nur transient heritabel, da die meisten epigenetischen Codes nur über einige Zellgenerationen stabil sind und meist nicht an die F2-Generation übertragen werden. So werden viele epigenetische Modifikationen während der Gametogenese und der frühen embryonalen Genese gelöscht und neu gesetzt (Davis et al., 2000; Reik und Walter, 2001; Reik et al., 2001). Diesen Vorgang bezeichnet man als Reprogrammierung (Reik et al., 2001; Fairburn et al., 2002).

Die bisher identifizierten epigenetischen Mechanismen umfassen vor allem unterschiedliche Histonmodifikationen sowie die Methylierung von Cytosinresten der DNA, welche als wichtigste epigenetische Modifikation des Genoms gilt. In den meisten Fällen führt die Methylierung zu einer Inaktivierung des betroffenen Gens.

Die Methylierung der Cytosinreste erfolgt durch das Enzym DNA-Methyltransferase (Dnmt; Ferguson-Smith and Surani, 2001), welches in mehreren Formen vorkommt. Dnmt1 remethyliert bei der identischen Replikation während des Zellzyklus die beiden neuen gebildeten DNA-Stränge an den Stellen, an denen der Mutterstrang ebenfalls methyliert war (Bestor, 2000; Bird, 2002). Die De novo Methylierung wird durch Dnmt3a und b und eventuell weitere Enzyme katalysiert (Okano et al., 1999). Sie erfolgt nach der Demethylierung spezifisch methylierter Regionen (Differentially Methylated Region = DMR) in den Keimzellen und auch in der frühen Embryogenese (Dean et al., 2003; Reik et al., 2003). In den frühen Urkeimzellen werden die vorhandenen Methylierungsmuster aufgehoben (Abb. 2.4), dieses ist ein sehr rascher und aktiver Prozess (Hajkova et al., 2002; Lee et al., 2002) und betrifft alle Gene inklusive der imprinted Genes. Während der Gametogenese werden ausschließlich keimzellspezifische epigenetische Markierungen gesetzt. In der frühen Embryonalphase, der zweiten Phase, in der es zu umfangreichen epigenetischen Reprogrammierungsvorgängen kommt, unterliegen die imprinted Genes jedoch keiner Demethylierung. Viele der imprinteten Gene haben eine DMR. Einige dieser DMRs stammen aus den paternalen Keimzellen und persistieren danach in der fetalen und adulten Phase (Hajkova et al., 2002; Lee et al., 2002). Neue Muster werden durch *De novo Methylierung* gebildet, dieses geschieht beim männlichen Tier in seiner Fetalphase und ist abgeschlossen in der *Prospermatogonienphase* und beim weiblichen nach der Geburt während der *Oozytogenese* (Reik et al., 2001; Reik und Walter, 2001; Ferguson-Smith und Surani, 2001). Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der epigenetischen Kontrolle der Genexpression (Reik und Walter, 2001). Bei Mäuseembryonen mit einem Dnmt-Mangel und einer daraus resultierenden Methylierungsschwäche kommt es zu einem frühen Absterben der Feten nach Abschluss der Plazentation (Jackson-Grusby et al., 2001).

Unmittelbar nach der Fertilisation der Eizelle kommt es zu einer abrupten, sehr schnellen und aktiven Demethylierung im paternalen Chromosomensatz, noch vor der ersten Zellteilung (Mayer et al., 2000; Reik et al., 2001; Dean et al., 2003). Im Gegensatz dazu findet man im maternalen Genom eine protrahierte passive Demethylierung, die im Zusammenhang mit einer fehlenden Remethylierung nach der DNA-Replikation steht (Monk et al., 1987; Dean et al., 2003). So wird das ganze parentale Genom, mit Ausnahme der imprinting Genes, in der praeimplantatorischen Entwicklung des Embryos demethyliert. Erst im Anschluss daran findet eine De novo

Methylierung des embryonalen Genoms statt (Abb. 2.4). Dean et al. (2003) zeigten, dass bei Mäuseembryonen diese De novo Methylierung während des Blastozystenstadiums stattfindet, bei Rinderembryonen ist die De novo Methylierung jedoch schon zwischen dem 8- und 16-Zellstadium zu erkennen. Dieses zeigt starke speziesspezifische Unterschiede im zeitlichen Ablauf.

Durch die Unterscheidung der Gene nach ihrer parentalen Herkunft kommt es zu einer Entwicklungsasymmetrie der elterlichen Erbinformation (Ferguson-Smith and Surani, 2001). Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei weiblichen Säugern (Monk et al. 1990, Avner und Heard 2001), diese ist von der Methylierung eines der beiden parentalen X-Chromosome abhängig. Epigenetische Modifikationen sind für die nächste Generation reversibel und stehen oft untereinander im funktionellen Zusammenhang. So können sie, wie Promotoren, über kurze Distanz als gen-spezifisches Regulationselement Einfluss nehmen oder über längere Distanzen auf die Aktivierung oder Inaktivierung einzelner Gene wirken (Ferguson-Smith and Surani, 2001). Für die phänotypische Ausprägung der epigenetischen Modifikation ist entscheidend, welches parentale Gen dem genetischen Imprinting unterliegt. Die Stabilität des Genoms wird ebenfalls durch die Methylierungsrate gewährleistet, was somit auch einen Einfluss auf die Krebspathogenese hat (Lengauer et al., 1997). Man kann in Tumorzellen eine *Hypomethylierung* an vielen Positionen der DNA detektieren, exklusiv derer, wo Gene für Tumorsuppression bekannt sind, hier liegt eine lokale *Hypermethylierung* vor (Barlow et al., 1993; Bird und Wolffe, 1999; Jones und Takai, 2001). Die Unterbindung oder Reduktion der Genexpression erfolgt hauptsächlich durch Chromatinkondensation an den Promotoren. Eine Gruppe von regulatorischen Proteinen bindet an dieser methylierten DNA (Bird, 2002).

Ein weiterer wichtiger epigenetischer Mechanismus sind die Histonmodifikationen. Hier können Histonproteine, die eine enge Beziehung zum Chromatin des Zellkerns haben, durch Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung modifiziert werden. Die Histonmodifikation kann eine schwächere oder stärkere Chromatinpackung bewirken und dadurch einzelne DNA-Abschnitte aktivieren oder stilllegen (*Gen-Silencing*, im Deutschen Gen-Stilllegung). Veränderungen an den Histonen unterliegen in der Entwicklung einem dynamischen Prozess, der durch spezifische Enzyme gewebeabhängig reguliert wird. Die

Acetylierung unterschiedlicher Aminosäurereste der Histone H3 und H4 ermöglicht eine Genexpression, weil hierdurch eine gelockerte, d.h. aktive Chromatinstruktur (*Euchromatin*) geschaffen wird. Im Gegensatz dazu führt eine Methylierung der Histone zu einem kondensierten, inaktiven Chromatin (*Heterochromatin*), welches keine Genexpression zulässt (Tamaru und Selker, 2001), wie z.B. bei der H3-Lysin-9-Acetylierung. Acetylierung an H3-Lysin-9 ist mit einer starken Genexpression assoziiert. Nach Abspaltung der Acetylgruppe durch die Histondeacetylase können Histone durch die Histonmethyltransferase methyliert werden. Durch diesen Vorgang wird eine Bindungsstelle am Histon für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) gebildet. An HP1 kann dann wiederum die Chromomethylase binden, welche methylierte DNA-Abschnitte weiter aufspiralisiert und stabilisiert, hierdurch kann dieser Bereich keine Gene mehr exprimieren (Jackson et al., 2002). Das System der Histonmodifikationen hat somit einen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression und auf die Interaktion mit anderen epigenetischen Regelmechanismen (Richards und Elgin, 2002).

2.4.3. Zusammenhang zwischen epigenetischen Störungen und LOS

Rinderembryonen aus SCNT zeigen ein verändertes Muster der Reprogrammierung (Abb. 2.4), dieses kann der Grund für die hohen Verlustraten und das Auftreten von Entwicklungsstörungen während der Trächtigkeit sein (Young und Fairburn, 2000). Ungeklärt ist, wie eine enukleierte Oozyte nach dem Kerntransfer mit der Reprogrammierung, d.h. mit der Demethylierung der somatischen DNA, beginnt (Fairburn et al., 2002), dieses wird aber vermutlich durch einen Oozyten-Faktor kontrolliert (Beaujean et al., 2004). Untersuchungen deuten auf eine passive Demethylierung hin und zeigen keine Anzeichen einer aktiven Demethylierung, wie der paternale Chromosomensatz nach einer natürlichen Befruchtung (Bourc'his et al., 2001). Bekannt ist, dass beim SCNT in der Oozyte nach der Aktivierung die Demethylierung begonnen hat und sich bis zum 2-Zell-Stadium vollzieht (Abb. 2.4). Im Gegensatz zu einem IVP-erzeugten-Embryo wird bei einem SCNT-Embryo aber schon im 4- bis 5-Zell-Stadium mit der De novo Methylierung begonnen (Dean et al., 2003). Die Untersuchungen von Dean et al. (2003) zeigen auch, dass sich einzelne SCNT-Embryonen unterschiedlich in ihrer Entwicklung verhalten, allen gemein ist jedoch eine unvollständige Demethylierung und damit eine insuffiziente Reprogrammierung des somatischen Chromatins aus der Spenderzelle (Bourc'his et

al., 2001, Dean et al., 2003). Diese veränderte Methylierung der DNA führt offensichtlich zu einer geänderten Genexpression, die Entwicklungsaberrationen des Embryos bei Rind und Maus nach sich ziehen können (Daniels et al., 2001; Humpherys et al., 2001).

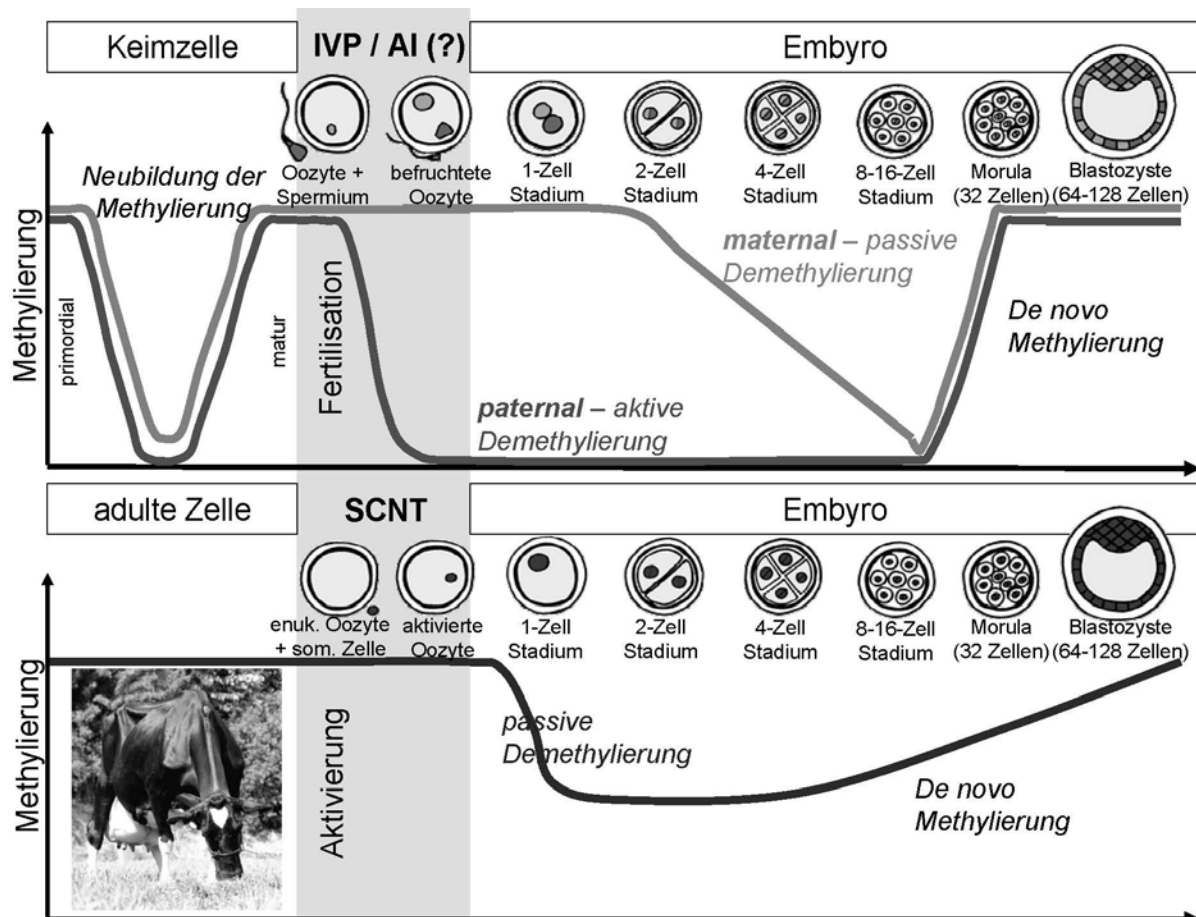


Abb. 2.4: Reprogrammierung des Genoms in der normalen frühembryonalen Entwicklung des Rindes und bei SCNT-Embryonen. In der normalen frühembryonalen Entwicklung kommt es nach der Fertilisation zu einer raschen aktiven Demethylierung des paternalen Chromosomensatzes, während der maternale allmählich passiv demethyliert wird. Dieses wurde an IVP-Embryonen erforscht und wird allgemein auch für AI-Embryonen angenommen. Bei SCNT Embryonen fand sich im entsprechenden Zeitraum eine unvollständige Demethylierung in Verbindung mit einer vorzeitig einsetzenden Remethylierung (modifiziert nach Dean et al., 2003; Reik et al., 2003).

Die Untersuchungen zum Vergleich der Reprogrammierung erfolgte wie oben beschrieben an SCNT- und IVP-Embryonen, ungeklärt ist ob die Ergebnisse der IVP

Embryonen wegen der in vitro-Maturation und -Fertilisation der Oozyten mit anschließender Embryokultivierung ein exaktes Bild der in vivo Reprogrammierung darstellen (Fairburn et al., 2002). Bei IVP-erzeugten Schafenembryonen sind auch Methylierungseffekte an imprinteten Genen gefunden worden, die zu einem veränderten Phänotyp führten (Young et al., 2001).

Zusammenhänge zwischen dem AOS/LOS und Störungen der epigenetischen Reprogrammierung bzw. der gestörten Expression von imprinted genes wurden ursprünglich aufgrund der Beobachtung hergestellt, dass bei spontanen bzw. experimentell induzierten Störungen der Expression von imprinted genes Wachstums- und Entwicklungsstörungen auftraten. Auf dem humanen Chromosom 11 Position 15.5 (11p15.5) und auf der homologen Region distal am Chromosom 7 der Maus (Lee und Feinberg, 1998; Engemann et al., 2000; Onyango et al., 2000) liegt die Sequenz, die in der Pathogenese des *Beckwith-Wiedemann Syndrome* (BWS) involviert ist. Symptome des BWS sind praenataler und postnatalen Überwuchs und eine Makroglossia (Bohlmann und Havers, 1971; Penchaszadeh, 1971), in den meisten Fällen ist eine vergrößerte Plazenta zu finden, die Kinder werden lebend geboren (Lage, 1991; McCowan und Becroft, 1994). An den Chromosomenden (11p15.5 des Menschen bzw. Chromosom 7 der Maus) finden sich die imprinted Cluster für IGF2 und H19 (Grandjean et al., 2000; Arney, 2003). Weksberg et al. (1993) entdeckten, dass es bei BWS zu einer bialleligen Expression des IGF2 kommt. Bei 10-20% der BWS Patienten ist eine paternale uniparentale Disomie (pUPD) an 11p15.5 vorhanden (Elliot und Maher, 1994; Weksberg et al., 2003). UPD bezeichnet, dass beide Chromosomen eines homologen Chromosomenpaares von einem Elternteil stammen. Bei Mäusen mit einer pUPD am distalen Chromosom 7 kommt es zu einem Abort durch eine plazentare Dysfunktion, da kein Spongiotrophoblast ausgebildet wird (McLaughlin, 1996). Eine Chimäre bei Mäusen mit einer paternalen Allel-Verdopplung des distalen Abschnitts von Chromosom 7 zeigt einen typischen BWS-Phänotyp (McLaughlin, 1997). Ein maternales UPD (mUPD) an 11p15.5 ist beim Menschen nicht überlebensfähig, da es zu einer starken Wachstumsreduktion kommt (Fisher et al., 2002). Bei Mäusen mit einer mUPD am homologen Chromosomenlocus, distaler Abschnitt des Chromosoms 7, sterben die Feten wachstumsretardiert zum Ende der Gravidität, die Plazenten dieser Tiere erreichen etwa 50% des physiologischen Gewichts (Scott et al., 2000). Dagegen beschreiben Gicquel et al. (2005) eine Epimutation an dieser Position innerhalb des

Silver-Russell Syndrome (SRS), das Krankheitsbild ist durch eine prae- und postnatale Wachstumsreduktion mit deutlicher Körperasymmetrie gekennzeichnet. Durch diese epigenetische Modifikation kommt es zu einer Downregulation der IGF2-Expression und einer bialleligen Expression von H19. Bei allen SRS liegt ein mUPD des humanen Chromosoms 7 in Verbindung mit anderen Disomien, bei etwa 10% der Fälle lag nur eine mUDP7 vor (Mergenthaler et al., 2000). Auf dem humanen Chromosom 7 liegen imprintete Gene, zum einen GRB10 (Growth Factor Receptor-bound Protein 10; 7p12) und PEG1/MEST (Paternally expressed Gen 1/Mesoderm specific Transkript; 7q32.2), die in die Pathogenese von SRS involviert sind (Hitchins et al., 2001). In der Region des humanen 7p11.2-p13 liegen neben GRB10 auch die Gene für IGFBP-1 und -3 (Hitchins et al., 2001). Untersuchungen von Kagami et al. (2007) zeigen eine partielle Hypermethylierung von PEG1/MEST im Zusammenhang mit SRS nach in vitro-Fertilisation.

2.4.4. Störungen der Genregulation beim LOS

Derzeit geht man hinsichtlich der Entstehung Biotechnologie-assoziiierter Entwicklungsstörungen davon aus, dass es durch Störungen epigenetischer Mechanismen während der frühembryonalen Phase zu einer aberranten Expression wachstums- und entwicklungsrelevanter Gene kommt (Niemann und Wrenzycki, 2000; Lazzari et al., 2002; Wrenzycki et al., 2004; Wrenzycki, 2007). Entsprechend wurde beim Vergleich zwischen durch unterschiedliche Methoden erzeugten Embryonen/Feten bzw. beim Vergleich von Embryonen mit unterschiedlicher Entwicklungskompetenz eine ganze Anzahl differenziell exprimierter Transkripte identifiziert (Tab. 2.1, nur auf die Spezies Rind beschränkt). Für diese Gene wurde dann eine Empfindlichkeit gegen die im Rahmen der angewendeten Biotechnologieverfahren durchgeführten Manipulationen bzw. eine Bedeutung in der Ätiologie Biotechnologie-assoziiierter Entwicklungsstörungen abgeleitet.

In der Literatur findet man unter der Angabe „in vivo“ nicht immer Graviditäten aus natürlicher Bedeckung oder künstlicher Besamung, sondern in vielen Fällen eine IVP-Herkunft, die ebenfalls Biotechnologie-assoziierte Entwicklungsalterationen aufweisen kann. Kenntnisse über Expressionsunterschieden in adulten Tieren nach in vitro-Manipulationen oder über differenziell regulierte Gene der Rinderplazenta in Korrelation zum LOS finden sich nicht in der aktuellen Literatur.

Tab. 2.1: Übersicht über differenziell regulierte Transkripte in Rinderoozyten und -embryonen in Abhängigkeit vom Verfahren der Erzeugung bzw. der Entwicklungskompetenz und Oozytenauswahl. Auf die Art der Expressionsunterschiede wird hier nicht eingegangen, dieses kann in der entsprechenden Quelle eingesehen werden.

| Parameter | Transkript | Referenz |
|---|--|--|
| Embryoentwicklung (in vitro versus in vivo, hier AI) | GDF9, Zyklin B1, G6PD1, SOX, MnSOD, CuSOD | Lonergan et al., 2000 |
| Qualität des Kumulus-Oozyten-Komplexes nach Morphologie | EP3 | Calder et al., 2001 |
| In vitro-Maturation mit unterschiedlichen Bedingungen bzw. Zusätzen | HSP, IGF1R, IGF2, IGF2R | Warzych et al., 2007 |
| | LEPR, STAT3, BAX, BIRC4 | Boelhauve et al., 2005 |
| | IGFBP6, HDCA1, HDAC2, Mash2, IFN γ , HSP, Oct4 | Russel et al., 2006 |
| | HSP, Poly A | Wrenzycki et al., 1999 |
| | Na/K α 1, Zyklin A | Watson et al., 2000 |
| | FSHR, Cx43, COX2, EP2, EP3 | Calder et al., 2001 Calder et al., 2005 |
| | FAS, FASLG, STAT3 | Paula-Lopes et al., 2007 |
| Blastozystenqualität in Bezug auf ihre Herkunft (in vivo versus in vitro versus SCNT) | GAPDH, Tubulin, DNMT, GATA 6, IFITM3 | Smith et al., 2007 |
| | ACOX1, CD81, DNAJC10, HRH1, TFAP2A | Smith et al., 2005 |
| | Glut3, Glut4, Glut8 | Knijn et al., 2005 |
| | FOXO3a, REA, HMG2, GNBL2, EEF1G | Corcoran et al., 2007 |
| Blastozystenentwicklung bis zum Transfer | Globin, Na/K, E-cad, Dc II, Plako, ZO-1, IFN γ , Glut-1, Glut-3, Glut-4 | Wrenzycki et al., 2003 |

Im Gegensatz zu vielen der in Tab. 2.1. aufgeführten entwicklungsrelevanten Genen ist über die Expression des IGF-Systems im Verlauf der embryonalen/fetalen

Entwicklung vieles bekannt, auch wenn hier auf andere Spezies verwiesen werden muss. Bei einer Inaktivierung des paternalen IGF2-Gens (Knock-out-Maus) kommt es zu einer Reduktion des Wachstums auf etwa 60% mit normalen Proportionen. Diese Wachstumsreduktion hält bis in die adulte Phase an. Die Körpergröße ist jedoch normal, wenn die Inaktivierung des maternalen Allels erfolgt (DeChiara et al., 1991). Produziert man eine Knock-out-Maus für den Promoter des plazentaspezifischen IGF2, erzielt man bei der Geburt die gleiche Wachstumsreduktion wie bei einem paternalen inaktiven IGF2-Gen, jedoch setzt sich diese nicht bis in die Erwachsenenphase fort (Constancia et al., 2002). Die Expression des maternalen IGF2-R-Allels führt zu einer Wachstumsinhibition der Feten. Eine Inaktivierung des paternalen IGF2-R-Allels führt zu einer Gewichtssteigerung von etwa 30% bei Mäusen und ist assoziiert mit einer IGF2-Konzentrationssteigerung im Plasma (Lau et al., 1994; Ludwig et al., 1996). Eine zweiallelige IGF2-Expression, d.h. paternale und maternale Expression, führt zu einer Gewichtssteigerung von 10% (Leighton et al., 1995). Dies bedeutet, dass ein mit neonataler Sterblichkeit assoziierter fetaler Überwuchs durch ein IGF2-Überangebot, auch sekundär durch einen IGF2-R Mangel, verursacht werden kann (Haig, 2004).

Das zweite Intron des IGF2-R-Gens beinhaltet eine als Region2 bezeichnete CpG-Insel (Cytosin-phosphadyl-Guanosin; Definition nach Thurston et al (2007): Länge > 500 Basenpaare, Guanin- und Cytosingehalt > 55%), die in der maternalen Herkunft stärker methyliert ist als in der paternalen (Stöger et al., 1993). Die Region2 beinhaltet den Promoter für Air (Antisense-IGF2-R-RNA; Sleutels et al., 2002). Air ist eine nicht kodierende RNA, welche paternal exprimiert wird (Lyle et al., 2000). Eine Deletion der paternalen Region2 führt zu einer Reaktivierung des IGF2-R auf der Vaterseite, die physiologischerweise während der Embryonal- und Fetalentwicklung eines Organismus ruhig gestellt ist (Wutz et al., 1997; 2001). Mäuse mit einer Deletion in Region2 werden mit einem reduzierten Gewicht geboren und behalten diese Gewichtsreduktion bis in die Adultphase bei (Wutz et al., 2001). Mäuse mit einem verkürzten Air-Transkript exprimieren ebenfalls zweiallelig IGF2-R und zeigen phänotypisch eine Gewichtsreduktion (Sleutels et al., 2002). Die maternale-IGF2-R-Expression ist damit ein Wachstumshemmer und die paternale-Air-Expression ein Wachstumsförderer (Haig, 2004). Auch bei Schafen wurden Wachstumsaberrationen

nach der IVP mit Expressionmodifikationen des IGF-Systems in Verbindung gebracht (Young et al., 2001; 2003).

Es ist offensichtlich, dass in der Pathogenese des LOS, AOS und eventuell auch in der des LPS Störungen der epigenetischen Reprogrammierung eine zentrale Rolle spielen, welche zu einem veränderten Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene, darunter auch Mitglieder des IGF-Systems, führt. Trotz einer mittlerweile erheblichen Anzahl von Untersuchungen zur Erforschung involvierter entwicklungsrelevanter Gene sind detaillierte Zusammenhänge bei der Entstehung des LOS/AOS/LPS derzeit noch weitgehend unklar.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsziele

Im ersten Abschnitt der Untersuchungen sollte in den Rinderplazentomen die physiologische Expression des IGF-Systems (Liganden, Rezeptoren und Bindungsproteine) beginnend mit dem 50. Trächtigkeitstag bis zur Geburt ermittelt werden.

Ziel des zweiten Untersuchungsabschnitts war ein Vergleich der IGF-System-Expression zwischen Rinderplazentomen aus zwei unterschiedlichen mit fetalem Überwuchs assoziierten in-vitro Produktionsprotokollen (IVP1- bzw. IVP2-Gruppe) und aus konventionellem Embryotransfer (Multiple-Ovulation-Embryo-Transfer; MOET-Gruppe). Diese Untersuchungen wurden an Plazentomen am 80. Tag der Gravidität durchgeführt.

3.2. Probengewinnung und Probenkonservierung

3.2.1. Probenmaterial zur Untersuchung der Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität

Diese Untersuchungen wurden an Plazentomen von insgesamt 29 Kühen durchgeführt. 21 Proben wurden während kommerziellen Schlachtungen auf dem Giessener Schlachthof gewonnen. Basierend auf der Scheitel-Steiß-Länge wurde das Gestationsalter bestimmt (Schnorr und Kressin, 2001) und diese Proben in drei Gruppen eingeteilt: **Gruppe G1:** Graviditätsdauer bis zum 99. Tag, **Gruppe G2:** vom 100. bis zum 199. Tag und **Gruppe G3:** vom 200. bis 280. Tag (Tab. 3.1). Die entnommenen Uteri wurden vom Schlachthof auf Eis gekühlt ins Labor verbracht und dort unmittelbar aufgearbeitet.

Tab. 3.1: Übersicht über die Beobachtungsgruppen G1–G3

| Tiernr. | Scheitel-Steiß-Länge (cm) | Graviditäts-Dauer (d)^{a)} | Verwendung |
|---------------------------------|----------------------------------|---|-------------------|
| Gruppe G1 (1. Trimester) | | | |
| G1.1 | 7,3 | 50 | PCR |
| G1.2 | 8,9 | 60 | PCR |
| G1.3 | 11,3 | 70 | PCR |
| G1.4 | 13,9 | 80 | IHC, PCR |
| G1.5 | 17,0 | 90 | IHC |
| Gruppe G2 (2. Trimester) | | | |
| G2.1 | 20,0 | 100 | IHC, PCR |
| G2.2 | 23,0 | 110 | IHC |
| G2.3 | 25,0 | 120 | IHC, PCR |
| G2.4 | 33,5 | 130 | IHC |
| G2.5 | 41,5 | 140 | IHC, PCR |
| G2.6 | 36,0 | 140 | IHC |
| G2.7 | 42,5 | 160 | IHC, PCR |
| G2.8 | 55,5 | 180 | IHC |
| Gruppe G3 (3. Trimester) | | | |
| G3.1 | 63,0 | 200 | IHC |
| G3.2 | 72,0 | 210 | IHC, PCR |
| G3.3 | 72,0 | 210 | IHC |
| G3.4 | 76,0 | 230 | IHC, PCR |
| G3.5 | 87,0 | 260 | IHC |
| G3.6 | 87,0 | 260 | IHC, PCR |
| G3.7 | 91,0 | 270 | IHC |
| G3.8 | -- | 280 ^{b)} | IHC, PCR |

IHC = Immunhistochemische Untersuchungen

PCR = Verwendung in der konventionellen und der Real-time RT-PCR

^{a)} = Berechnung der Graviditätsdauer erfolgte mittels Scheitel-Steiß-Länge (Schnorr und Kressin; 2006)

^{b)} = Probenmaterial dieses Tieres wurde am 280 Tag p. insem. im Rahmen einer *Sectio caesarea* gewonnen. Mittels einer Progesteronbestimmung wurde bestätigt, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme der präpartale Progesteronabfall noch nicht eingetreten war.

Für die Charakterisierung der Regulationsvorgänge in der Rinderplazenta unmittelbar präpartal wurden weiterhin drei Tiere mit bekannten Besamungsdaten erworben, in der Klinik eingestellt und der **Gruppe PP** (Tab. 3.2) zugeordnet. Bei diesen Tieren wurde in 8-stündigen Intervallen eine Messung der Progesteronkonzentration vorgenommen (ACS:180 unter Verwendung des Kits PGRE, Siemens Medical Solution Diagnostics, Erlangen). Ziel dieser Messungen war es, eine Probenentnahme im Rahmen einer *Sectio caesarea* vorzunehmen, sobald der Eintritt des präpartalen Progesteronabfalls durch Unterschreiten einer Konzentration von 1,5 ng/ml (4,8 nmol/l) zu erkennen war. Bei keinem dieser Tiere waren Anzeichen einer beginnenden Geburt vorhanden. Zur Ermittlung der unter der Geburt herrschenden Expression wurden fünf Tiere herangezogen, die nach einem physiologischen Graviditätsverlauf einen spontanen Geburtseintritt zeigten, jedoch wegen einer Dystokie (relativ oder absolut zu große Frucht) einer *Sectio caesarea* unterzogen werden mussten (**Gruppe T**, Tab. 3.3).

Die Proben der **Gruppen PP** und **T** wurden sofort nach der Entnahme ins Labor verbracht und aufgearbeitet. Für beide Gruppen war maßgeblich, dass die Kälber matur und vital waren. Die Probengewinnungen an lebenden Tieren wurde bei der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Giessen; Aktenzeichen II 25.3 – 19c 20 / 15cG / 18 / 14) angezeigt und genehmigt.

Tab. 3.2: Übersicht über die präpartale Beobachtungsgruppe (Gruppe PP)

| Probennr. | Progesteronkonzentration ng/ml * | Verwendung |
|-----------|-------------------------------------|-----------------|
| PP.1 | 0,7 | <i>IHC, PCR</i> |
| PP.2 | 0,3 | <i>IHC, PCR</i> |
| PP.3 | 1,4 | <i>IHC, PCR</i> |

* zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Tab. 3.3: Übersicht der Beobachtungsgruppe zum Zeitpunkt der Geburt (T)

| Probennr. | Verwendung |
|-----------|-----------------|
| T.1 | <i>IHC, PCR</i> |
| T.2 | <i>IHC</i> |
| T.3 | <i>IHC, PCR</i> |
| T.4 | <i>IHC, PCR</i> |
| T.5 | <i>IHC</i> |

3.2.2. Probenmaterial zur Untersuchung der Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus IVP- bzw. MOET-Trächtigkeiten am 80. Graviditätstag

Die in-vitro produzierten Embryonen (IVP1 bzw. IVP2) wurden nach zwei unterschiedlichen Protokollen im Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilian Universität, München hergestellt und in der Trägartierherde der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub übertragen. Die detaillierten Protokollangaben für beide IVP-Gruppen finden sich in Hiendleder et al. (2006). Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Protokollen ist der Gonadotropin-Zusatz zum Oozytenmaturationsmedium (IVP1: 0,01 U/ml bovines FSH und 0,01 U/ml bovines LH; IVP2: 0,2 U/ml ovines FSH). Im Gegensatz zu Hiendleder et al. (2006) wurden die Embryonen in dieser Arbeit einheitlich mit 10% Estrus Cow Serum (ECS) im Medium kultiviert, d.h., dass im IVP1-Protokoll der Zusatz von 5% in der Originalmethode auf 10% im vorliegenden Experiment erhöht wurde. Zur Steigerung der Trächtigkeitsrate wurden jeweils zwei Embryonen pro Trägartier am siebten Tag nach der in-vitro Fertilisation übertragen.

Als Kontrollen dienten Embryonen, die durch MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer) gewonnen wurden und ebenfalls in der oben genannten Trägartierherde übertragen wurden. Der MOET erfolgte ohne vorherige Zykluskontrolle der Spendertiere. Dazu wurden die Spendertiere mittels PRID®-Spirale (Progesteron, Östradiolbenzoat; CEVA GmbH, Deutschland), welche 10 Tage intravaginal platziert wurde, und 150 µg Cloprostenol (Dalmazin®; Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH) i.m. brunstinduziert. Noch unter Einfluss der PRID®-Spirale wurden die Spendertiere mit insgesamt 800 IU Pluset® (Follitropin und Lutropin vom

Schwein; Pharmanovo, Deutschland) i.m. über vier Tage in absteigender Menge nach Angabe des Herstellers behandelt und somit die Superovulation induziert. Zwei Tage nach Entfernung der PRID-Spirale erfolgten zwei terminorientierte Besamungen im Abstand von 12 Stunden. Zur Sicherung einer ausreichenden Ovulationsrate wurde acht Stunden vor der ersten Besamung 20 µg Buserelin (Receptal[®], Intervet, Deutschland) i.m. appliziert. Die Embryonen wurden 7 Tage nach der Insemination aus den Spendertieren gespült und jeweils zwei auf die Trägartiere übertragen. Die entsprechenden Trägartiere wurden mit einer einmaligen intramuskulären Gabe von 150 µg Cloprostenol (Dalmazin[®]; Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH) brunstinduziert.

Die Graviditäten (IVP1: n = 5; IVP2: n = 6; MOET: n = 5) stammten aus einer genetisch eng verwandten Brown Swiss-Grundlage, um einen eventuellen genetischen Einfluss auf die Versuchsergebnisse zu minimieren. Auf der Vaterseite wurde für alle Gruppen das Sperma des Brown Swiss-Bullen „Simvitel“ (Herdbuch-Nr. 20/78380, ID 27600091363895) verwendet. Als Trägartiere dienten in allen Fällen Fleckvieh-Färsen. Die tierexperimentellen Arbeiten an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub erfolgten unter der Leitung von Herrn Dr. H.-D. Reichenbach. Der Tierversuch wurde bei der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Oberbayern) angezeigt und genehmigt.

Alle Trägartiere wurden am 80. Tag der Gravidität, gerechnet vom Zeitpunkt der Fertilisierung bzw. der Insemination, im Versuchsschlachthof der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub geschlachtet und die Uteri entnommen. Innerhalb weniger Minuten gelangten die graviden Uteri in ein dem Versuchsschlachthof angegliedertes Labor. Hier wurde unmittelbar mit der Entnahme und Präparation der Proben begonnen. An allen Feten wurden die Scheitel-Steiß-Länge, der Brustumfang, das Gewicht und das Geschlecht bestimmt. Bei Zwillingegraviditäten musste aus versuchstechnischen Gründen auf eine Zuordnung der entnommenen Plazentome zum zugehörigen Fetus verzichtet werden. Aus diesem Grund stimmt die Anzahl der Feten und der Plazentom-Proben nicht überein (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Übersicht der Feten aus den Versuchsgruppen mit Angaben von Geschlecht, Größenparametern sowie den dazu gehörigen Plazentom-Proben-Nummern. Diese Daten wurden von Herrn Prof. Dr. S. Hiendleder für Berechnungen im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

| Anzahl, Geschlecht* | Scheitel-Steiß- Länge (cm) | Brustumfang (cm) | Gewicht (g) | Plazentom- Proben-Nr. |
|------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------|--------------------------|
| IVP1-Gruppe | | | | |
| 1,0 | 14,4 | 10,2 | 103,3 | 1-1 |
| 1,1 | 14,6/14,8 | 10,4/9,7 | 105,2/92,0 | 1-2 |
| 2,0 | 14,5/14,1 | 10,0/9,5 | 97,7/85,6 | 1-3 |
| 1,0 | 15,3 | 10,6 | 121,0 | 1-4 |
| 2,0 | 13,5/12,6 | 9,4/8,4 | 85,8/71,5 | 1-5 |
| IVP2-Gruppe | | | | |
| 1,0 | 14,2 | 10,1 | 93,3 | 2-1 |
| 1,0 | 15,6 | 10,5 | 115,4 | 2-2 |
| 1,1 | 13,1/12,7 | 9,0/8,5 | 77,3/63,4 | 2-3 |
| 1,0 | 15,1 | 10,3 | 117,7 | 2-4 |
| 1,1 | 14,0/14,0 | 10,0/10,3 | 94,8/97,7 | 2-5 |
| 1,0 | 15,1 | 10,3 | 105,0 | 2-6 |
| MOET-Gruppe | | | | |
| 1,1 | 10,6/11,0 | 8,3/9,2 | 58,9/72,9 | M-1 |
| 1,0 | 11,0 | 9,3 | 78,2 | M-2 |
| 0,2 | 10,7/11,0 | 8,6/8,2 | 65,2/58,8 | M-3 |
| 0,1 | 10,9 | 8,3 | 61,7 | M-4 |
| 1,1 | 11,0/11,3 | 9,0/9,1 | 64,9/62,3 | M-5 |

* die Position vor dem Komma gibt die Anzahl der männlichen, die hinter dem Komma die der weiblichen Feten wieder. Angaben, die in der Summe beider Positionen 2 sind, stehen für eine Zwillingsgravidität.

3.2.3. Probenkonservierung

Für die Untersuchungen mittels Immunhistochemie (IHC) wurden je Muttertier mindestens drei Plazentome entnommen. Diese wurden für 24 Stunden in 10%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kantenlänge der Gewebestücke maximal 0,5 cm betrug, um eine rasche Fixierung zu gewährleisten. Zur Auswaschung des Fixans wurden die Gewebestücke über mehrere Tage in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) aufbewahrt. Die Pufferlösung wurde in diesem Zeitraum mehrfach gewechselt. Anschließend wurden die Gewebeproben jeweils für 24 Stunden in 30, 50 und 70%igem Alkohol dehydriert, danach erfolgte die Einbettung in Paraffin.

Zur Erstellung von Expressionsprofilen im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt wurden die für die Präparation von RNA vorgesehenen Gewebestücke der Plazentome in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Plazentome aus den IVP- und MOET-Graviditäten wurden in RNeasyTM (Ambion Biotechnology GmbH, Wiesbaden) bei 4°C über Nacht inkubiert und dann bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Für separate Untersuchungen der fetalen bzw. maternalen RNA-Expression wurden Plazentome manuell in die Anteile Kotyledone und Karunkel getrennt. Die so präparierten Probenanteile wurden für die RNA-Präparation wie oben für Gesamtplazentome beschrieben konserviert.

3.2.4. Statistische Auswertung der Daten zu Größe und Gewicht der Feten aus den IVP- und MOET-Gruppen

Die Daten zu Größe und Gewicht der Feten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hiendler für statistische Berechnungen im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. In der statistischen Auswertung sollte auf Unterschiede phänotypischer Merkmale zwischen den Versuchsgruppen untersucht werden.

Dazu wurde auf einen Einfluss der Versuchsgruppe (IVP1-, IVP2- oder MOET-Gruppe) und der Fetenzahl (Einling/Zwilling) auf die fetalen Größenparameter (Scheitel-Steiß-Länge [SSL], Brustumfang [BU], Gewicht und den Quotienten BU/SSL) in zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Wechselwirkung zwischen

Versuchsgruppe und Fetenzahl geprüft (Software: BMDP7D; BMDP Statistical Software, Inc.).

3.3 Untersuchungen

3.3.1. Qualitativer Nachweis von Zielgen-mRNA mittels konventioneller RT-PCR

3.3.1.1. RNA-Isolierung aus den Plazentomen

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Gewebeproben wurden mit steriler Aluminiumfolie umwickelt und in flüssigen Stickstoff verbracht. Durch Schläge mit einem sauberen Hammer erfolgte die mechanische Vorzerkleinerung. Die Gewebesplitter wurden in einen vorgekühlten und in einem Eisbad platzierten Mörser überführt und unter Verwendung eines vorgekühlten, sterilen Pistills unter flüssigem Stickstoff mit mechanischem Druck weiter zerkleinert. Das hieraus entstandene Gewebepuder (ca. 100 mg) wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol[®] gegeben und die Homogenisierung mittels eines Ultra-Turrax[®] T-8 (IKA-Werk GmbH, Staufen) weiter fortgeführt.

Die weitere Gesamt-RNA-Isolierung mittels der Trizol-Methode erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Trizol[®]-Reagenz-Herstellers (BibcoBRL, Life Technologies).

Die in Trizol[®] homogenisierten und gelösten Proben wurden mit 300 μl eisgekühltem ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) Chloroform (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) versetzt und durch kräftiges Schütteln vermischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation (12400 g, 15 min, 4°C) getrennt. Die wässrige obere Phase (RNA-haltig) wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Fällung wurde ein gleicher Volumenteil Isopropanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugegeben und die Probe für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen. Die Probe wurde anschließend bei 14810 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zweimaliges Waschen des Sediments mit eiskaltem 70%igem Ethanol (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) entfernte zelluläre Verunreinigungen. Das

Pellet wurde etwa 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, bis der Ethanolgeruch verstrichen war. Die Resuspension erfolgte in 50 µl DEPC-Wasser.

Zum Schutz der frisch gewonnenen resuspendierten RNA vor enzymatischem Abbau wurde 1 U/ml RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) zugesetzt.

Die Konzentration der Gesamt-RNA (ng/µl) wurde mittels eines UV-Spektrophotometers (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Hamburg) bestimmt. Hierzu wurde eine 1:20-Verdünnung der RNA mit DEPC-Wasser hergestellt und die Extinktion bei 260 nm in einer Kunststoff-Einmalküvette (Eppendorf Uvette® 220 – 1600 nm, Westbury, USA) gemessen. Aus der ermittelten Extinktion wurde die Gesamt-RNA Konzentration berechnet. DEPC-Wasser diente als Leerwert.

Mittels der gemessenen RNA Konzentration wurde eine Arbeitsverdünnung von 0,2 µg Gesamt-RNA/µl hergestellt, die bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert wurde. Die unverdünnte RNA-Stammlösung wurde bei –80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3.1.2. Konventionelle RT-PCR

Experimente unter Verwendung der konventionellen RT-PCR wurden zu folgenden Zwecken durchgeführt:

- Qualitative Bestätigung der Zielgen-Expression vor der Etablierung der Real-Time RT-PCR-Methode. Dies war vor allem für solche Parameter von Bedeutung, über deren Expression in der Rinderplazenta zu Beginn der eigenen Arbeit keine Informationen vorlagen (IGFBP-1 bis -7).
- Überprüfung der für die Real-Time RT-PCR selbst entwickelten Primerpaare auf ihre Funktionsfähigkeit vor der Bestellung der zugehörigen Taqman-Sonden.

3.3.1.2.1. DNase-Behandlung

Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch Amplifikation genomischer DNA in der Probe wurde vor jeder RT-PCR eine DNase-Behandlung der gewonnenen RNA durchgeführt.

Alle zur DNase-Behandlung nötigen Pipettievorgänge erfolgten auf Eis. In 0,25 ml Plastikreaktionsgefäßen wurde zunächst ein DNase-Mix (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) angesetzt (Zusammensetzung Tab. 3.5). Zum DNase-

Mix (Gesamtvolumen 3,25 µl) wurden 6,65 µl RNA-Lösung (0,2 µg/µl) zugegeben, somit ergibt sich ein Endvolumen von 9,9 µl.

Tab. 3.5: Zusammensetzung des DNase-Mix für die DNase-Behandlung

| Komponenten | Einfacher Ansatz | Stammlösung |
|----------------------|------------------|-------------|
| MnCl ₂ | 1 µl | 10 mM |
| PCR-Puffer | 1 µl | 10 x |
| DNase I – RNase-frei | 1 µl | 10 U / µl |
| RNase-Inhibitor | 0,25 µl | 40 U / µl |
| Gesamtvolumen | 3,25 µl | |

Für die DNase-Behandlung wurde ein T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) mit folgenden Reaktionsbedingungen programmiert:

Schritt 1: 10 min 37,0°C
 Schritt 2: 5 min 75,0°C
 Schritt 3: abkühlen auf 4,0°C

Nach der DNase-Behandlung ist die RNA nur für eine kurze Zeit stabil, so dass die im Anschluss anstehende Reverse Transkription (RT) unmittelbar durchgeführt werden musste.

3.3.1.2.2. Reverse Transkription (RT)

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des RT-PCR Core Kits (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Startprimer für die Reaktion wurden unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers) aus dem oben genannten Kit verwendet.

Um die Stabilität aller Komponenten zu gewährleisten, erfolgten alle Pipettievorgänge auf Eis. Pro Ansatz wurde 1,5 µl der DNase behandelten RNA-Lösung dem 8,5 µl RT-Mastermix (Zusammensetzung Tab. 3.6) zugegeben.

Tab. 3.6: Zusammensetzung des RT-Mastermix für die Reverse Transkription

| Komponenten | Einfacher Ansatz | Stammlösung |
|------------------------|------------------|-------------|
| MgCl ₂ | 2 µl | 25 mM |
| PCR-Puffer | 1 µl | 10 x |
| dNTP-Mix ¹⁾ | 4 µl | 10 mM |
| Random Hexamers | 0,5 µl | 50 µM |
| RNase-Inhibitor | 0,5 µl | 20 U/µl |
| Reverse Transkriptase | 0,5 µl | 50 U/µl |
| Gesamtvolumen | 8,5 µl | |

¹⁾ Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix

Nach Zugabe von 1,5 µl RNA-Lösung wurde die Probe anschließend in den T1 Thermocycler 48 (Whatman Biometra, Göttingen) verbracht und wie folgt behandelt:

- Schritt 1: 8 min 21°C (*Oligo-Primer-Hybridisierung*)
 Schritt 2: 15 min 42°C (*Transkription*)
 Schritt 3: 5 min 99°C (*Beendigung der Transkription und Zerstörung der Oligo-Primer*)
 Schritt 4: 5 min 5°C
 Schritt 5: abkühlen auf 4°C

Die bei der RT synthetisierte cDNA ist stabil und wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.3.1.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die qualitative Hot-Start PCR wurden 10 µl der cDNA-Lösung (Abschnitt 3.3.1.2.2.) mit 40 µl Primer-Mix (Zusammensetzung Tab. 3.7b) vermischt. Der Primer-Mix bestand aus einer Pufferlösung (PCR-Prämix; Zusammensetzung Tab. 3.7a), einem genspezifischen Primerpaar und der thermostabilen DNA-Polymerase (GOLD AmpliTaq®).

Die rinder- bzw. schafspezifischen Primerpaarsequenzen für die Amplifikation von Insulin-like Growth Factor 1 und 2 (IGF1 und IGF2), der beiden Rezeptoren

(IGF1-R und IGF2-R), der sieben Insulin-like Growth Factor Bindungsproteine (IGFBP 1-7) sowie von β -Aktin sind in Tabelle 3.8 mit der entsprechenden Annealingtemperatur, der Amplikonlänge (bp) und der Accession-Nummer der zugrunde liegenden Nukleotidsequenzen in der Genbank aufgeführt. Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe einer Computer-Software (Oligo Analyzer 1.0.2/Oligo Explorer 1.1.0, Freeware aus dem Internet; © Teemu Kuulasma, University of Kuopio, 70211 Kuopio, Finnland) erstellt oder der Literatur entnommen und von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien synthetisiert.

Tab. 3.7a: Zusammensetzung des PCR-Prämix

| Komponenten | Einfacher Ansatz | Stammlösung |
|-------------------|------------------|-------------|
| MgCl ₂ | 2 μ l | 25 mM |
| PCR-Puffer | 4 μ l | 10 x |
| DEPC-Wasser | 32,75 μ l | |
| Gesamtvolumen | 38,75 μ l | |

Tab. 3.7b: Zusammensetzung des Primer-Mixes

| Komponenten | Einfacher Ansatz | Stammlösung |
|--|------------------|------------------|
| PCR-Prämix | 38,75 μ l | -- |
| Primer-Vorverdünnungsmix ^{a)} | 1 μ l | 10 pmol/ μ l |
| GOLD AmpliTaq [®] | 0,25 μ l | 5 U/ μ l |
| Gesamtvolumen | 40 μ l | |

^{a)} Sense- und Antisense-Primer (jeweils 20 pmol/ μ l in DEPC-Wasser) wurden vorab in gleichen Anteilen gemischt, so dass beide Primer in dem Primer-Verdünnungsmix in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l vorliegen

Bei jeder PCR wurde als Positivkontrolle das House-keeping Gene β -Aktin mitgeführt, um die Integrität der verwendeten cDNA zu überprüfen. Als Negativkontrolle wurde anstelle der RNA DEPC-Wasser bei der DNase-Behandlung eingesetzt und in den folgenden Schritten bis zur Amplifikation wie eine Probe behandelt. Hierdurch können eventuelle Kontaminationen mit RNA oder DNA von Substraten und Lösungen erkannt und ausgeschlossen werden.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR lauteten wie folgt:

Schritt 1: 10 min 95°C (*Initiale Denaturierung & Aktivierung*)

Beginn der Zyklen

Schritt 2: 1 min 94°C (*Denaturierung*)

Schritt 3: 2 min primerpaarabhäng. Temperatur (*Primer-Hybridisierung*)

Schritt 4: 1,5 min 72°C (*Polymerisation*)

35 Wiederholungen der Schritte 2 - 4

Ende der Zyklen

Schritt 5: 10 min 72°C (*finale Polymerisation*)

Schritt 6: abkühlen auf 4°C (*bis zur Entnahme*)

3.3.1.2.4. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden 1,82 g Agarose (GibcoBRL, Life Technologies) in 91 ml 1x TBE Puffer aufgekocht und darin gelöst. Aus dieser Zusammensetzung resultiert ein 2%iges Agarosegel. Nach Abkühlung auf ca. 60–80°C wurden 1,8 µl 1%ige Ethidiumbromid-Lösung (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) zugesetzt, gründlich vermischt und das flüssige Gel in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Keutz, Labortechnik GmbH, Reiskirchen) ausgegossen und bis zum endgültigen Verfestigen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Ausbildung der gewünschten Geltaschen wurde ein 20-zähliger Kamm vor dem Erstarren eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer verbracht und diese mit 1x TBE Puffer gefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel 0,5 cm oberhalb des Gels lag.

In die Geltaschen wurden jeweils ein Gemisch aus 15 µl des PCR-Produktes und 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) pipettiert. Zur Größenbestimmung des Amplikons wurde 1 µl eines DNA-Größenstandards (100 bp DNA Ladder; GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit 1,5 µl Ladepuffer und 7 µl DEPC-Wasser versetzt und flankierend in die äußeren Geltaschen eingebracht. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung von 125 V und 300 mA Stromstärke (Stromversorgung: Power Supply LKB Bromma, Golden, USA) für 30 min. Die Detektion der elektrophoretisch getrennten Proben

erfolgte im UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jansdorf) bei einer Wellenlänge von 312 nm aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids, welches in die DNA interkaliert.

Die Gele wurden mittels des Phoretix TotalLab (Biostep, Labor- und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf) und der entsprechenden Fotosoftware (Phoretix Grabber 3.01, Biostep, Labor- und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf) fototechnisch dokumentiert.

Tab. 3.8: Übersicht über die in der qualitativen PCR verwendeten Primer, deren Annealing-Temperatur sowie die Länge der jeweils gebildeten Produkte

| Zielgen | Primerpaare 5'-3' | Annealing-temp. (°C) | Länge (bp) | Accession-Nr. bzw. Referenz |
|----------------|---|----------------------|------------|-----------------------------|
| IGF1 | (for) ACA AAC CCC ACC CAC AAA G (rev) GAA GCA GCA CTC ATC CAC GA | 63 | 353 | XM-612412 |
| IGF2 | (for) TGG TGC TTC TTG CCT TCT TG (rev) GCT GCG TCG GTT TAT GAG G | 60 | 161 | NM-174087 |
| IGF1-R | (for) TGC TGG ACA CCT ACA ACA TC (rev) CAA AGA CAA AGT TGG AGG | 58 | 192 | XM-590355 |
| IGF2-R | (for) GTG GGA AAA CCT TGG GAA CT (rev) GCC TGT CAT TGC TCA CGA G | 60 | 378 | NM-174352 |
| IGFBP-1 | (for) TGC GAT GAG GCT ACA GAT AC (rev) CCA CTC CAA GGG TAG ACA C | 58 | 389 | NM-174554 |
| IGFBP-2 | (for) AGA AGG TCA CGG AGC AGC A (rev) ACA CCA GCA CTC CCC ACG C | 63 | 278 | NM-174555 |
| IGFBP-3 | (for) GAG GAA ATG GCA GTG AGT C (rev) TAT TCT GTC TCA CGC TTG GA | 58 | 229 | NM-174556 |
| IGFBP-4 | (for) ACA AGG CGT GTG CAT GGA (rev) GGG TGA GTA GGT CTC CTC T | 60 | 427 | Hastie et al. (2004) |
| IGFBP-5 | (for) TCG TGC GGC GTC TAC ACT (rev) GGG TGA GTA GGT CTC CTC T | 60 | 207 | Hastie et al. (2004) |
| IGFBP-6 | (for) GAA TCC GAA GGA GAG TAA GCG C (rev) GTC ACA ATT GGG CAC GTA GAG TG | 63 | 229 | Hastie et al. (2004) |
| IGFBP-7 | (for) GGT GCC CAG GTG TAT TTG A (rev) CAT ATT CTC CGG CAT CTT CC | 58 | 220 | XM-868373 |
| β-Aktin | (for) ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG (rev) GCA TTT GCG GTG GAC AAT GGA | 58 - 63 | 890 | Shemesh et al. (1997) |

for = forward; rev = reverse; bp = base pair;

3.3.1.2.5. *Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Die PCR-Produkte (siehe Abschnitt 3.3.1.2.3.) wurden anschließend durch Sequenzierung auf ihre Spezifität kontrolliert. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH (Oberursel). Hierzu musste das Amplikon in gereinigter Form vorliegen. Für die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus einem 2%igem Agarosegel wurde der Qiaex II Gelextraktions Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels UV-Licht in einem Ethidiumbromid-gefärbten Gel bei 312 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sterilen Skapells so genau wie möglich ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das Gewicht bestimmt. Die anschließenden Extraktionschritte erfolgten nach Angaben des Kit-Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden).

3.3.2. Quantitative Messung der Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der relativen Expression der Zielgene (IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R und IGFBP 1-7) erfolgte nach dem TaqMan-Sonden-Verfahren.

Zur Erstellung von Expressionsprofilen im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt wurden Untersuchungen an Gesamtplazentomen zu allen beprobten Trächtigkeitsstadien durchgeführt. Parallel dazu erfolgten separate Messungen in Kotyledonen- und Karunkelgewebe. Da bei einer Trächtigkeitsdauer von weniger als 100 Tagen keine ausreichend saubere Trennung von fetalem und maternalem Plazentomanteil erzielt werden konnte, wurde bei diesen Tieren (1. Trimester) auf eine separate Erfassung der Expression in Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe verzichtet (Tab. 3.9). Auch bei den am 80. Graviditätstag beprobten Tiere der IVP- bzw. MOET-Gruppen (Tab. 3.4) erfolgten aus diesem Grund die Messungen ausschließlich an Gesamtplazentomen.

Für die Real-Time PCR muss analog zur konventionellen RT-PCR die mit DNase vorbehandelte RNA in ein geeignetes Template (cDNA) mittels Reverser Transkriptase umgeschrieben werden. Dies erfolgte nach den in den Kap. 3.3.1.2.1. und 3.3.1.2.2. für die konventionelle RT-PCR beschriebenen Verfahren.

Tab. 3.9: Übersicht der zur Erstellung von Trächtigkeitsprofilen mittels Real-Time RT-PCRs verwendeten Proben. Nähere Angaben zu den aufgeführten Proben finden sich im Abschnitt 3.2.1.

| Messung in Gesamtplazentomen | Messung in Kotyledonen und Karunkeln |
|------------------------------|---|
| 1. Trimester | |
| G1.1 | |
| G1.2 | |
| G1.3 | |
| G1.4 | |
| 2. Trimester | |
| G2.1 | G2.2 |
| G2.3 | G2.6 |
| G2.5 | |
| G2.7 | |
| 3. Trimester | |
| G3.2 | G3.3 |
| G3.4 | G3.5 |
| G3.6 | |
| G3.8 | |
| Präpartal (PP) | |
| PP.1 | PP.2 |
| PP.2 | PP.3 |
| PP.3 | |
| Geburt (T) | |
| T.1 | T.1 |
| T.3 | T.3 |
| T.4 | |

3.3.2.1. TaqMan-Sonden Verfahren

Wie bei der konventionellen PCR wird auch in diesem Verfahren ein sequenzspezifisches Primerpaar zur Amplifikation genutzt. Zusätzlich wird für die Reaktion ein weiteres kurzes Oligonukleotid benötigt, welches als Gensonde

spezifisch zwischen den entsprechenden Primerpaaren an die DNA-Matrize bindet. Dieses Oligonukleotid wird als TaqMan-Sonde bezeichnet. Es ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Carboxylfluorescein; „6-FAM“) markiert und trägt am 3'-Ende eine Fluoreszenz-löschende Verbindung (Carboxyltetramethyl-Rhodamin; „TAMRA“), den so genannten Quencher.

Befindet sich die gesuchte Ziel-cDNA im PCR-Ansatz, verlängert die Taq-Polymerase komplementär die Sequenz ausgehend von den spezifisch gebundenen Primern. Bei dieser Synthese stößt die Taq-Polymerase auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, welche hierdurch abgebaut wird. Dieser Abbau bewirkt eine Trennung des Fluoreszenzfarbstoffes (F) und des Quenchers (Q). Bei Anregung kann nun ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, welches positiv mit der PCR-Produktzunahme korreliert. Bei diesem Verfahren macht man sich die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze, die nur bei einem DNA-Doppelstrang funktioniert, sodass ungebundene Sonden nicht abgebaut werden und somit keine falsch positiven Signale verursachen können.

3.3.2.2. Real-Time RT-PCR

3.3.2.2.1. Durchführung der Real-Time RT-PCR

Zur Durchführung der Real-Time RT-PCR fand der TaqMan® qPCR Master Mix der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) Verwendung.

Die Gesamt-RNA jeder Probe wurde wie in Kap. 3.3.1.2.1. und 3.3.1.2.2. beschriebenen präpariert und in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz für die Real-Time PCR ist in Tab. 3.10 aufgelistet. Zu den 20 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl cDNA-Lösung zugegeben. Jede Probe wurde in einer Doppelbestimmung analysiert.

Unter Verwendung von 96-well optical plates (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde die Real-Time PCR in dem automatischen Fluorometer ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tab. 3.10: Zusammensetzung des Real-Time RT-PCR-Reaktionsansatzes

| Komponenten | Einfacher Ansatz | Stammlösung |
|------------------|------------------|-------------|
| qPCR Master Mix | 12,5 µl | 2 x |
| Sense-Primer | 1,5 µl | 5 µM |
| Antisense-Primer | 1,5 µl | 5 µM |
| TaqMan-Sonde | 1,0 µl | 5 µM |
| DEPC-Wasser | 3,5 µl | |
| Gesamtvolumen | 20,0 µl | |

Schritt 1: 10 min 95°C (*Initiale Denaturierung*)

Beginn der Zyklen

Schritt 2: 15 sek 95°C (*Denaturierung*)

Schritt 3: 1 min 60°C (*Primer-Hybridisierung & Polymerisation*)

40 Wiederholungen der Schritte 2-3

Ende der Zyklen

In der Tabelle 3.11 sind die sequenzspezifischen Primer und die TaqMan-Sonden dargestellt, welche mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ausgewählt wurden. Die Primer und die Sonden wurden bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

Vor dem Einsatz in der Real-Time PCR wurden diese Primer mittels konventioneller RT-PCR (Kap. 3.3.1.2.3.) getestet und die jeweiligen Produkte auf ihre Spezifität (Kap. 3.3.1.2.4. und 3.3.1.2.5.) überprüft.

Tab. 3.11: Übersicht der Sequenzen der in der Real-Time RT-PCR verwendeten Primer (for bzw. rev) und TaqMan-Sonden (pro)

| Zielgen | Primerpaare und Sonden (pro) 5'-3' | Position (nt) | Access.-Nr. / Referenz |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|
| IGF1 | (for) AGC AGG TGA AGA TGC CCA TCA CA (rev) GGT GAA GGC GAG CAA GCA (pro) CCT CCT CGC ATC TCT TCT ATC TGG CCC | 261 331 284-310 | NM-1077828 |
| IGF2 | (for) TGC CTC TAC GAC CGT GCT T (rev) GAC TGC TTC CAG ATG TCA TAT TGG (pro) CGG ACG ACG TCA CCG CAT ACC C | 564 642 582-603 | NM-174087 |
| IGF1-R | (for) GCT CAA CCC AGG GAA CTA CAC A (rev) GAT CCG TCC ACG ACC CAT T (pro) CCC GGA TCC AGG CCA CCT CTC T | 2196 2219 2219-2241 | XM-606794 |
| IGF2-R | (for) CCA GCA CTT CAG TCG CAA A (rev) GGT CGC CAT CTT GAA CGT (pro) TCG GAA CCT CCA ACC AAA CCA GAT AC | 6797 6861 6817-6843 | NM-174352 |
| IGFBP-1 | (for) TGT CCC CAG AGA GCT CAG AGA TA (rev) CAC TGG ACT CGG CCA TCA A (pro) CTC AGG AGC AGC TTC TGG ACA ATT TCC A | 486 557 510-537 | NM-174554 |
| IGFBP-2 | (for) ATG CGC CTT CCG GAT GA (rev) GGC CAT GCT TGT CAC AGT TTG (pro) TCC CCT GGA GCA CCT CTA CTC CCT ACA C | 697 772 720-747 | NM-174555 |
| IGFBP-3 | (for) CAG CCT CTG GTT GGA TCC AT (rev) GGT AGG CGG AAC ATC TTT GAG A (pro) CAC ACA GCC CTC CTG GAG AAC ACA AAG | 2245 2320 2269-2295 | NM-174556 |
| IGFBP-4 | (for) GCA AGT GCC TGC AGA AGC A (rev) GCG CCC CGA TGA CCT T (pro) CCA AAA TTC GAG ACC GGA GCA CCA | 651 728 675-698 | NM174557 |
| IGFBP-5 | (for) GGG TTT GCC TGA ACG AAA AG (rev) TCG TGC TCA CGG GAG TCT CT (pro) CTA CCG CGA GCA AGC CAA GAT CGA | 322 388 344-367 | NM-1105327 |
| IGFBP-6 | (for) AAG GAG AGT AAG CCC CAA GCA (rev) CCC CGA GTT CCT CTG TTG GT (pro) ACT GCT CGC TCG CAG GAC GTG AAC | 392 466 416-439 | NM-1040495 |
| IGFBP-7 | (for) TGA GTG CCA TGC ATC CAA TT (rev) TCA TGT AAG GCA TCA ACC ACT GT (pro) CAA GGA CAG GCT TCA GCA TCA GCA AA | 733 897 755-780 | XM-868373 |
| GAPDH | (for) GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A (rev) TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTC AC (pro) CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T | 929 1010 962-986 | Schuler et al. (2005) |

3.3.2.2.2. *Auswertung der Real-Time RT-PCR*

Hinsichtlich der Expressionsquantifizierung von Zielgenen mittels Real-Time RT-PCR kann man in eine absolute und eine relative Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Kopiezahl des gesuchten Genes in der absoluten Menge angegeben, hierfür wird jedoch zur Regressionsgradenberechnung ein genauer Standard benötigt. Bezieht man die Expression des Zielgenes auf ein Referenzgen (House-keeping Gene), spricht man von der relativen Quantifizierung. Bei der Wahl des House-keeping Genes ist wichtig, dass es in dem untersuchten Gewebe möglichst konstant exprimiert wird. Zielgen und Referenzgen sollten in der PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen, da nur so eine ausreichend exakte relative Quantifizierung möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit kam Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als House-keeping Gene für die relative Quantifizierung zum Einsatz.

Durch die fluoreszierende Eigenschaft der TaqMan-Sonde nach Abbau durch die Taq-Polymerase wird der Fluoreszenz-Schwellenwert als Basis für die Berechnung der Quantifizierung herangezogen. Dieser Schwellenwert wird als Threshold-Cycle (C_T -Wert) bezeichnet und ist dem PCR-Zyklus gleichzusetzen, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Wegen der geringen Templatekonzentration im Reaktionsansatz zu Beginn der PCR ist eine spezifische Fluoreszenz zunächst nicht detektierbar, somit wird lediglich die Hintergrund- oder Basisfluoreszenz gemessen. Am C_T -Wert ist die Amplifikation (Bildung von doppelsträngiger cDNA) exponentiell und wird in dieser Phase nicht durch Primer- oder Nukleotidmangel sowie durch nachlassende Enzymaktivität eingeschränkt. Der C_T -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglichen cDNA-Konzentration, welche in den Versuchansatz einpipettiert wurde. Damit gilt: je höher die initiale Template-Konzentration ist, umso weniger Zyklen werden benötigt, um ein signifikantes Fluoreszenzsignal zu detektieren und umso niedriger ist damit der entsprechende C_T -Wert.

Zur Ermittlung der relativen Expression des gesuchten Zielgenes wird im ersten Schritt der ΔC_T -Wert des Zielgens gegen das Referenzgen (GAPDH) normalisiert:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ GAPDH}}$$

Die Darstellung der relativen Genexpression erfolgt in Beziehung zu einem Kalibrator. Als Kalibrator dient die Probe mit der niedrigsten Expression des Zielgens, das bedeutet die Probe mit dem höchsten C_T -Wert. Dieser Wert ($\Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$) wird nun von den ΔC_T -Werten sämtlicher Proben subtrahiert:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Targetgene}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$$

Durch den nun ermittelten $\Delta\Delta C_T$ kann schließlich die relative Genexpression (RGE) berechnet werden:

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Mit der RGE wird die n-fache Überexpression eines Genes im Vergleich zu der Probe mit der geringsten Expression angegeben (Kalibrator). Da der $\Delta\Delta C_T$ des Kalibrators 0 ist, ergibt sich für ihn ein RGE-Wert von 1.

Bei der getrennten Messung nach Karunkel und Kotyledone wurde für die Auswertung der Kalibrator aus den Messungen an Gesamtplazentomen angewendet. Hierdurch können RGE-Werte entstehen, die kleiner 1 sind. Dieses gilt auch für die Ermittlung der RGE-Werte bei den Gruppen IVP-1, IVP-2 und MOET.

3.3.2.3. Statistische Auswertung der mittels Real-Time RT-PCR gemessenen relativen Genexpression

Die Werte für die relative Genexpression wurden in den einzelnen Gruppen (G.1, G.2, G.3, PP und T sowie IVP-1-, IVP-2- und MOET-Gruppe) geometrisch gemittelt (\bar{x}_g), da es sich um eine relative Änderung im Verhältnis zum Kalibrator handelt. Die Variabilität der Stichproben wurde durch den einfachen Streubereich ($\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$) dargestellt.

Bezüglich der Trächtigkeitsprofile, die unter Verwendung von Gesamtplazentomen als Probenmaterial erstellt wurden, erfolgte die Prüfung auf

einen Einfluss des Trächtigkeitsstadiums mittels einfaktorieller ANOVAs, da jeweils mehr als zwei unverbundene Stichproben vorlagen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ schloss sich ein paarweiser Gruppenvergleich mittels Tukey-Kramer-Test an (Software: Statistical Software GraphPad3; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Die Daten zur relativen Genexpression aus Untersuchungen an Kotyledonen- bzw. Karunkelproben wurden zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholung bezüglich des Faktors „Gewebeherkunft“ unterzogen, um neben dem Trächtigkeitsstadium auf einen Einfluss der fetalen und der maternalen Herkunft zu prüfen (Software: BMDP2V; BMDP Statistical Software, Inc.).

Die Daten zur relativen Genexpression aus Untersuchungen an IVP- bzw. MOET-Graviditäten wurde durch einfaktorielle ANOVAs auf einen Einfluss des Verfahrens der Embryoproduktion (IVP1, IVP2, MOET) geprüft (Software: BMDP2V; BMDP Statistical Software, Inc.). Beim Auftreten von Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden die Versuchsgruppen paarweise mittels Tukey-Test verglichen (Software: BMDP7D; BMDP Statistical Software, Inc.). Weiterhin wurden Korrelationsanalysen zwischen der relativen Genexpression und den fetalen Größenparametern (Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Verhältnis BU/SSL) bzw. dem Gewicht durchgeführt, wobei die Daten aller drei Versuchsgruppen gepoolt wurden. Bei signifikanten Korrelationen zwischen Genexpression und fetalen Größenparametern bzw. dem Fetusgewicht wurden die Korrelationskoeffizienten und Regressionsgeraden ermittelt (Software: BMDP6D; BMDP Statistical Software, Inc.)

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wird in den Befundbeschreibungen mit folgenden Bedeutungen angegeben: $p < 0,05$ = „signifikant“, $p < 0,01$ = „hoch signifikant“ und $p < 0,001$ = „höchst signifikant“. P-Werte zwischen 0,05 und 0,1 werden als „statistisch auffällig“ bezeichnet, da ein eventuell bestehender Unterschied möglicherweise aufgrund der für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung stehenden, relativ geringen Probenzahl nicht als statistisch signifikant erkannt wurde.

3.3.3. Immunhistochemische Untersuchungen

Für den immunhistochemischen Nachweis von IGF1, IGF2, IGF1-R und IGF2-R in formalinfixierten, paraffineingebetteten Plazentaprobeen kamen zwei unterschiedliche Protokolle zum Einsatz. Für IGF1, IGF2, IGF1-R (alpha-Untereinheit) und IGF1-R (beta-Untereinheit) wurde das immunhistochemische Protokoll an die von Kölle et al. (1997) publizierte Methode angelehnt (Kap. 3.3.3.1.). Die Darstellung des IGF2-R richtete sich nach dem von Hoffmann und Büttner (1998) beschriebenen Verfahren (Kap. 3.3.3.2.). Die verwendeten Primärantikörper sind in Tab 3.12 aufgeführt.

Tab. 3.12: Übersicht der in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper und Isotypenkontrollen

| Name/Antigen | Klon | Hersteller | Immunogen | Verdünnung | Spezies / Typ |
|-------------------------------|--------------------------|--|--|----------------------|-------------------------|
| IGF1 | IGF-I (H70) Sc-9013 | Santa Cruz | Aminosäuren 49-118 des humanen IGF1 | 1:50 | Kaninchen polyklonal |
| IGF2 | IGF-II (H103) Sc-5622 | Santa Cruz | Aminosäuren 78-180 des humanen IGF2 | 1:50 | Kaninchen polyklonal |
| IGF1-R α-Unterein. | IGF-IR (N20) sc-712 | Santa Cruz | N-Terminus der humanen IGF1-R α- Untereinheit | 1:100 | Kaninchen polyklonal |
| IGF1-R β-Unterein. | IGF-IR (C20) sc-713 | Santa Cruz | C-Terminus der humanen IGF1-R β- Untereinheit | 1:100 | Kaninchen polyklonal |
| IGF2-R | 5299HL | Dr. Peter Lobel, Uni. of New Jersey | boviner kationenun- abhängiger- MPR/IGF2-R, extracytoplasma- tische Domäne | 1:1000 | Kaninchen monoklonal |
| Negativ- Kontrolle | I-5006 - IgG | Sigma Chemical Company, St. Louis, USA | irrelevant | 1:50 bzw 1:100 | Kaninchen polyklonal |
| Negativ- Kontrolle | Mab IgG1 | Dianova GmbH, Hamburg | irrelevant | 1:1000 | Kaninchen monoklonal |

3.3.3.1. Immunhistochemische Darstellung von IGF1, IGF2 und IGF1-R

Es wurden formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben verwendet. Die 4 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf SuperFrost-Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und bei 37°C für 2 Stunden getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte für 3 x 10 min in Xylol (Raumtemperatur). Durch eine absteigende Ethanolreihe (je 2 x 5 min in absolutem, 1 x 5 min 90%igem, 1 x 5 min 80%igem und 1 x 5 min 70%igem Ethanol) und durch Waschung für 5 min in Aqua dest wurden die Schnitte rehydriert.

Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die Schnitte für 30 min in 1%igem eiskaltem (-20°C) H₂O₂-Methanol inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 3 x 5 min in PBS-Puffer und 1 x 5 min in PBS-Puffer + bovines Serumalbumin (1 g auf 70 ml PBS-Puffer) gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch eine 20minütige Inkubation mit 10% Ziegenerum (Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) in PBS-Puffer blockiert.

Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Proben mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper für IGF1, IGF2 und der beiden IGF1-R Untereinheiten erfolgte in PBS-Puffer in den in Tab. 3.12 angegebenen Verdünnungen. In den Negativkontrollen wurden unspezifische Antikörper in der jeweils gleichen Verdünnung in PBS-Puffer eingesetzt.

Nichtgebundene Primärantikörper wurden nach Ablauf der Inkubationsdauer 3 x 5 min in PBS-Puffer abgewaschen und die Schnitte anschließend mit dem Sekundärantikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper aus dem Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), welcher in PBS-Puffer 1:200 verdünnt wurde. Nach weiteren Waschungen (3 x 5 min) in PBS-Puffer wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex aus oben genanntem Kit nach Angaben des Herstellers für 30 min bei Raumtemperatur überschichtet. Danach wurde durch mehrmalige Spülungen in PBS-Puffer überschüssiger, nicht gebundener Avidin-Biotin-Komplex entfernt. Die Lokalisation des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes wurde durch Inkubation in der Substratlösung (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; Peroxidase-Substratkit-AEC; BioPrime,

Kronshagen) nachgewiesen. Die Beendigung der Farbreaktion erfolgte durch Spülung unter fließendem Wasser. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxin (1:4; Merck, Darmstadt) wurden die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Da AEC eine relativ instabile Farbreaktion bewirkt, wurden die Schnitte innerhalb von zwei Wochen nach der immunhistochemischen Färbung mikroskopisch untersucht und ausgewertet.

3.3.3.2. Immunhistochemische Darstellung des IGF2-R

Die Schnittanfertigung erfolgte nach dem in Kap. 3.3.4.1.1. aufgeführten Verfahren.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte für 2 x 10 min in Xylol (Raumtemperatur) inkubiert. Durch eine absteigende Ethanolreihe (je 2 x 2 min in absolutem, 95%igem und 70%igem Ethanol) und Waschung für 5 min in fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte rehydriert.

Für die Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 3 x 5 min in vorgeheiztem Citratpuffer in der Mikrowelle bei 560 Watt gekocht. Die durch den Kochvorgang verdampfte Flüssigkeit wurde zwischen den Erhitzungsschritten durch destilliertes Wasser ersetzt. Zur Abkühlung wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur in Citratpuffer und anschließend 5 min unter fließendem Wasser gewaschen. Eine 30minütige Inkubation mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid in absolutem Methanol blockierte die endogene Peroxidaseaktivität. Anschließend wurde die Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung von den Schnitten entfernt und diese in 0,3%igem Triton X-100 in IHC-Puffer (pH 7,2) für 5 min gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte dann für 10 min mit 10%igem Ziegenerum (Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) inkubiert.

Nach Entfernung des Blockungserums wurden die Proben mit dem Primärantikörper überschichtet und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Für den Primärantikörper wurde eine Verdünnung von 1:1000 in IHC-Puffer gewählt. Als Negativkontrolle diente ein irrelevanter monoklonaler Kaninchen-Antikörper der IgG1-Subklasse (Mab IgG1; Dianova, Hamburg) in gleicher Proteinkonzentration (Tab. 3.12).

Der überschüssige Primärantikörper wurde nach der Inkubation durch zweimaliges Waschen in IHC-Puffer für 10 min entfernt und die Schnitte anschließend mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper aus dem Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), welcher in IHC-Puffer 1:200 verdünnt wurde. Nach einer weiteren 10minütigen Waschung in IHC-Puffer wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex aus dem oben genannten Kit nach Angaben des Herstellers überschichtet.

Nicht gebundener Avidin-Biotin-Komplex wurde durch Spülung mit IHC-Puffer (10 min bei Raumtemperatur) entfernt und die Schnitte mit der Substratlösung (NovaRed substrate kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach 5 min durch Spülung in fließendem Wasser gestoppt. Eine Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxilin (Verdünnung 1:4; Merck, Darmstadt). Durch eine ansteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min in Ethanol 70%ig, 80%ig, 90%ig und absolut) sowie durch eine anschließende Inkubation in Xylol (2 x 10 min) wurden die Schnittpräparate dehydriert und anschließend mit Histokit (Assistent, Osterode) eingedeckt.

3.3.3.3. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Präparate (siehe Kap. 3.3.3.1. und 3.3.3.2.) erfolgte lichtmikroskopisch bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung mit einem Leica Leitz DM RM (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar). Für die fototechnische Dokumentation wurde die Mikroskopkamera Leica DC300 (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar) mit dazugehöriger PC-Software (Leica IM-1000; Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) verwendet.

Für die semi-quantitative Auswertung der immunhistochemischen Reaktion wurde eine von Özgen et al. (1997) beschriebene Methode verwendet. Der von ihnen verwendete „*Immunreaktive Score*“ (IRS) geht auf eine Arbeit von Remmle und Stegner (1987) zur Beurteilung der Östrogenrezeptor-Expression in humanen Mammakarzinomen zurück. In den Plazentomproben wurde die Färbeintensität in folgenden Zelltypen beurteilt:

Karunkel

- Stroma
- Gefäßwände (getrennt nach Intima, Media und Externa)
- Kapillare
- Karunkelepithel (getrennt nach Zytoplasma und Nukleus)

Kotyledone

- Stroma der Chorionzotten
- Kapillare
- einkernige Trophoblastzellen (getrennt nach Zytoplasma und Nukleus)
- Trophoblastriesenzellen (getrennt nach Zytoplasma und Nukleus)

Zunächst wurden für jeden Zelltyp die prozentualen Anteile negativer, schwach, mittel und stark gefärbter Zellen ermittelt. Im Gegensatz zu der von Özgen et al. (1997) beschriebenen Originalmethode erfolgte keine visuelle Schätzung, sondern eine genaue Auszählung anhand 400 ausgewerteter Zellen. Lediglich für die größeren Gefäße (mit Intima, Media und Externa) wurde die Verteilung der Signalintensitäten geschätzt. Hierdurch konnten mehr als 400 Zellen erfasst werden, da sonst das Problem bestand, nur ein Gefäß in die Auswertung mit aufnehmen zu können.

Tab. 3.13: Färbeintensitätseinteilung der Zellen und Angaben der entsprechenden Wichtungsfaktoren.

| Farbreaktion | Wichtungsfaktor |
|----------------|-----------------|
| negativ | 0 |
| schwach | 1 |
| mittel | 5 |
| stark | 10 |

Im nächsten Schritt wurden diese prozentualen Anteile mit einem entsprechenden Wichtungsfaktor (SI-Wert; s. Tab. 3.13) multipliziert. Die Wichtungsfaktoren betrugen 0, 1, 5 bzw. 10 für eine negative, schwache, mittlere bzw. starke Farbreaktion. Die Summe dieser Produkte, geteilt durch 100 ergab dann den immunreaktiven Score (IRS), welcher Werte zwischen 0 (alle Zellen negativ) und 10 (alle Zellen stark gefärbt) annehmen kann.

3.3.3.4. Statistische Auswertung der immunreaktiven Scores

Die errechneten immunreaktiven Scores der erfassten Zelltypen wurden für die einzelnen Beobachtungsgruppen (G.1, G.2, G.3, PP und T) arithmetisch (\bar{x}) gemittelt. Die Variabilität der Messwerte in den Stichproben wurde durch die Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur Prüfung der Abhängigkeit der IRS-Werte von der Beobachtungsgruppe wurde für jeden ausgewerteten Zelltyp eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Ergaben sich hierbei Signifikanzen ($p < 0,05$), wurden für die betroffenen Zelltypen paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Beobachtungsgruppen mittels Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wird in den Berechnungen mit folgenden Bedeutungen angegeben: $p < 0,05$ = „signifikant“, $p < 0,01$ = „hoch signifikant“ und $p < 0,001$ = „höchst signifikant“. P -Werte zwischen 0,05 und 0,1 werden als „statistisch auffällig“ bezeichnet, da ein eventuell bestehender Unterschied möglicherweise aufgrund der für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung stehenden, relativ geringen Probenzahl nicht als statistisch signifikant erkannt wurde.

3.4. Alphabetische Liste der verwendeten Puffer, Lösungen, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.4.1. Puffer und Lösungen

10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für die Mikrowellenbehandlung

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure

$C_6H_8O_7 \times H_2O$ 21,0 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ 29,41 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A 9 ml

Stammlösung B 41 ml

Aqua dest. 450 ml

DEPC-Wasser für die konventionelle und Real-time RT-PCR

1 ml DEPC auf 1 l Aqua dest.

12 Stunden bei 37 °C unter Rühren inkubieren

20 min bei 121 °C autoklavieren

Ethanol (Alkohol) – Reihe für die IHC

Ethanol (96%)

Ethanol reinst (100%) 96 ml

Aqua dest. 4 ml

Ethanol (70%)

Ethanol reinst (100%) 70 ml

Aqua dest. 30 ml

Ethanol (50%)

| | |
|-----------------------|-------|
| Ethanol reinst (100%) | 50 ml |
| Aqua dest. | 50 ml |

Ethanol (30%)

| | |
|-----------------------|-------|
| Ethanol reinst (100%) | 30 ml |
| Aqua dest. | 70 ml |

Formaldehyd 4%ig, gepuffert (pH 7,0) für Gewebefixation (Formol nach Lillie)

Wässrige Formaldehyd-

| | |
|---|------------|
| Lösung | 500 ml |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 32,5 g |
| Aqua dest. | ad 5000 ml |

H₂O₂-Lösung 0,3%ig für die IHC

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| H ₂ O ₂ 30%ig | 2 ml |
| Aqua dest. | ad 200 ml |

IHC-Puffer (pH 7,2 – 7,4)

| | |
|----------------------------------|------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 1,2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| KCl | 0,2 g |
| NaCl | 8,0 g |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

pH 7,2 – 7,4 einstellen und anschließend 3 ml Triton X-100 zugeben

PBS-Puffer für die IHC

| | |
|--------------|--------|
| PBS-Tablette | 1 |
| Aqua dest. | 200 ml |

Phosphatpuffer (pH 7,2) zur Aufbewahrung der fixierten Gewebeproben*Lösung A:*

| | |
|---|------------|
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 13,8 g |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

Lösung B:

| | |
|--|------------|
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 17,8 g |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

Gebrauchslösung:

| | |
|----------|----------|
| Lösung A | 14,15 ml |
| Lösung B | 35,85 ml |

TBE (10x) Puffer

| | |
|--|------------|
| Tris | 108 g |
| Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (≥ 99% T) | |
| Borsäure | 55 g |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) | 40 ml |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

TBE (1x) Puffer für die Gelelektrophorese

| | |
|------------------|------------|
| TBE (10x) Puffer | 100 ml |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

3.4.2 Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien besitzen proanalytische Qualität

- ABC-Komplex: VECTASTAIN® Elite ABC-Kit, PK-6101, Rabbit IgG, (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Agarose Multi-Purpose (Roche Applied Science, Mannheim)
- BA2000; Horse anti mouse IgG biotinylated antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Borsäure, Pufferan® (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Bovines Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen)

- Chloroform (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- DNase 1, RNase-free, 10 U/µl (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- Eisessig 100% wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)
- Essigsäure 1 N (Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethanol 99,6%, DAB 10 (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Ethidiumbromidlösung 1% (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
- Gene Amp Gold RNA PCR Core Kit® (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
- Hämatoxilin (Merck KGaA, Darmstadt)
- Hexan (Merck KGaA, Darmstadt)
- Histokitt (Assistent, Osterode)
- Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumphosphat monobasisch (Fluka, Neu-Ulm)
- Kaliumhydrogenphosphat (Fluka Chemie GmbH, Buchs)
- 6x Loading Dye (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Peroxidase Kit: Vector® Nova-Red (Linearis Biologische Produkte GmbH, Wertheim)
- Peroxidase-Substrat AEC-Kit (BIOLOGO, Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Kronshagen)
- RNase-Away (Molecular Bioproducts, San Diego, USA)
- Rnase-Inhibitor, 40 U/µl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- TRIS: Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Fluka, Neu-Ulm)
- Triton 100 (Serva, Heidelberg)
- Wasserstoffperoxid, 30%ig (Merck KGaA, Darmstadt)

3.4.3. Verbrauchsmaterialien

- Einmalmesser für Microtom: Leica DB 80L, Leica Microsystems (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Handschuhe UniGloves® (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Papiertücher Kimwipes (Ladd Industries, Williston)
- PAP-Pen (G. Kisker-Biotech, Steinfurt)
- PCR-Tubes 0,5 ml, ultradünn, RNase-/DNase-Pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Reaktionsgefäße 2 ml (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Thermo-Fast® Detection Plate (ABgene, Hamburg)
- Uvette® (Eppendorf AG, Hamburg)

3.4.4. Geräte

- Einbettungsautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)
- Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg)
- Flachgel-Elektrophoresekammer Midi 100 x 150 mm, Gießkammer und Kamm (Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)
- Laborwasseraufbereitungsanlagen: Aqua demineralisata Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage „Milli Q“, Water Purification System, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)
- Magnetrührer MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Kelheim)
- Microtom Leica RM 2125 RT (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Paraffinausgießstation „Histoembedder EG 1160“ (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Phoretix TotalLab (Biostep, Labor- und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf)
- pH-Meter (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- T1 Thermocycler Biometra (Biotron, Göttingen)
- Ultra-Turrax® T-8 mit Dispergierwerkzeug S8 N-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)
- UV-Lampe UVGL-25 (UVP, San Gabriel, USA)
- UV-Transluminator mit Bildbearbeitungssoftware Phoretix Grabber 3.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Vakuum Pumpe KNF Neuber, Typ 035.1.2 AN. 18 (KNF Neuberger, Freiburg)

- Vortexer Heidolph REAX control (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Vortex-Evaporator (Fa. Haake Buchler GmbH, Karlsruhe)
- Waage „Mettler AE160“ und „Mettler PJ 300“ F.Nr.33650 (Mettler Toledo, Giessen)
- Wasserbad Typ WB-24; (Medax Nagel, KG Kiel)
- Wasserbad GFL 1083 (Bezug: MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf)
- Zentrifuge Varifuge 0-6000 U/min (Fa. Heraeus Christ GmbH, Hanau)

4. ERGEBNISSE

4.1. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität und unter der Geburt

4.1.1. IGF1

4.1.1.1. Expression auf mRNA-Ebene

Mittels konventioneller RT-PCR konnte in den Rinderplazentomen die Expression von IGF1-mRNA qualitativ in allen untersuchten Stadien der Gravidität sowie unter der Geburt nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 353 bp zu sehen (Abb. 4.1).

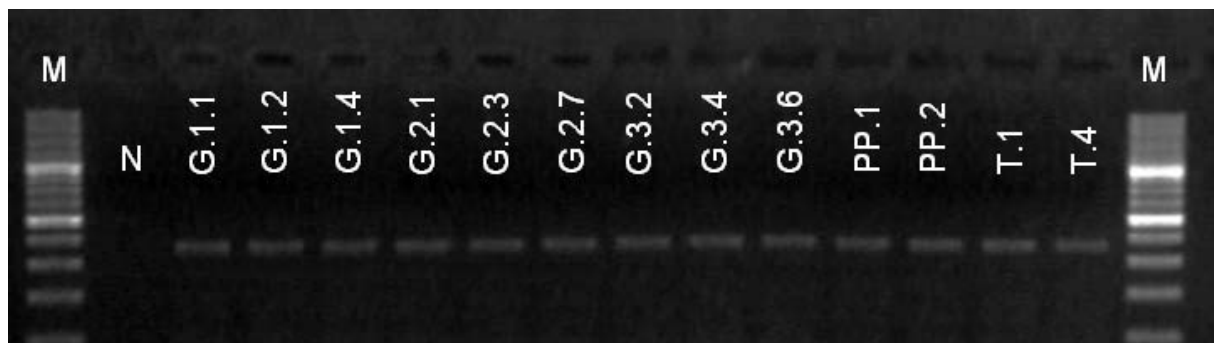


Abb. 4.1: Qualitativer Nachweis von IGF1-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 353 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Für die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Expression der IGF1-mRNA in den Gesamtplazentomen konnte im Verlauf der Gravidität ein höchst signifikanter Zeiteffekt ($p < 0,001$; einfaktorielle ANOVA) ermittelt werden (Abb. 4.2). Die höchste Expression wurde mit einem mittleren RGE-Wert von 89,8 im ersten

Trimester beobachtet, welche sich signifikant ($p < 0,01$) von allen anderen untersuchten Stadien unterschied. Im restlichen Trächtigkeitsverlauf zeigten sich deutlich niedrigere Expressionen (mittlere RGE-Werte zwischen 2,2 bis 12,4). Signifikante Unterschiede waren zwischen dem zweiten Trimester und der präpartalen Phase ($p < 0,01$) sowie dem zweiten Trimester und der Geburt ($p < 0,05$) zu erkennen.

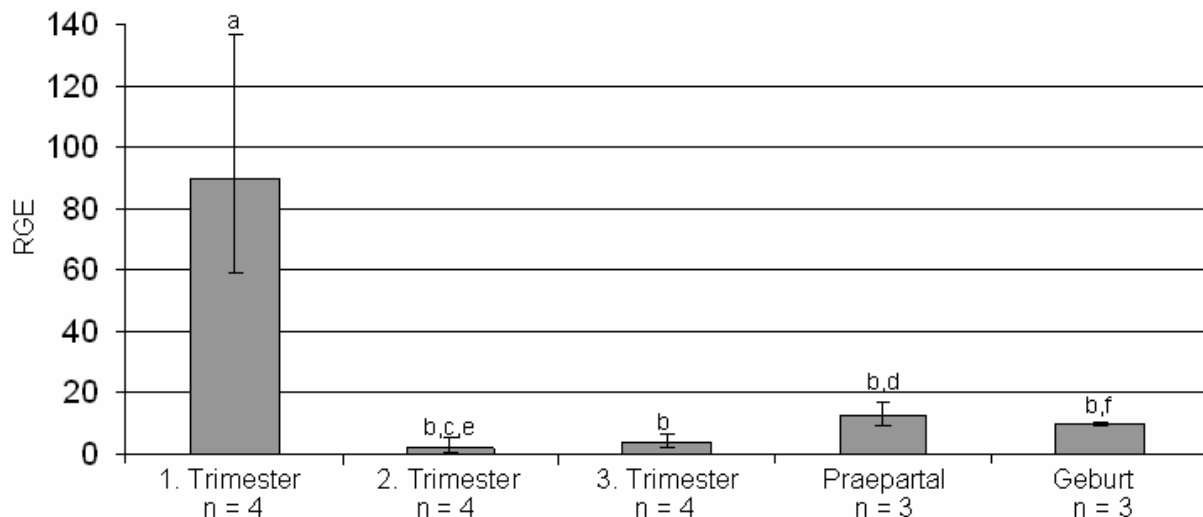


Abb. 4.2: Expression von IGF1-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p < 0,001$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. (a-b = $p < 0,001$; c-d = $p < 0,01$; e-f = $p < 0,05$; Tukey-Test).

Bei der separaten Messung der IGF1-mRNA-Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und der Geburt (Abb. 4.3) wurde in der zweifaktoriellen ANOVA eine Signifikanz für die Beobachtungsgruppe verfehlt, ihr Effekt ist jedoch statistisch auffällig ($p = 0,060$). Für die Herkunft des Probenmaterials – Kotyledone bzw. Karunkel – ergab sich jedoch eine deutliche Signifikanz ($p < 0,001$). Hierbei war in allen Beobachtungsgruppen die Expression in den Karunkeln höher als in den Kotyledonen. Die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ist statistisch auffällig ($p = 0,098$). In den Karunkeln wurde die höchste Expression der IGF1-mRNA im präpartalen Zeitraum (mittlerer RGE-Wert 16,8) und unter der Geburt (mittlerer RGE-Wert 15,8)

gemessen. Diese Werte unterschieden sich deutlich vom zweiten und dritten Trimester (3,3 bzw. 3,1). In den Kotyledonen wurden zwischen den untersuchten Stadien keine erheblichen Expressionsunterschiede gefunden.

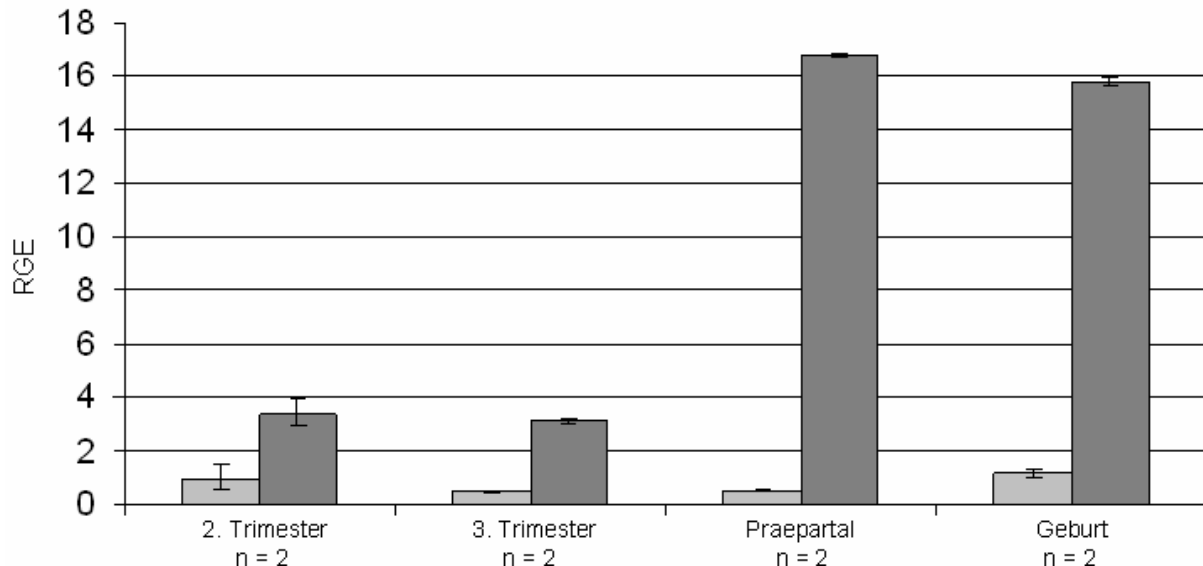


Abb. 4.3: Expression von IGF1-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p < 0,001$), während der Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,060$) und die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,098$) nicht signifikant, jedoch statistisch auffällig waren.

4.1.1.2. Expression auf Proteinebene

Bei der immunhistochemischen Darstellung von IGF1 mittels eines polyklonalen Kaninchenantikörpers gegen das humane IGF1, Aminosäuren 49-118 (Tab. 3.12), ergab sich zu allen untersuchten Phasen der Gravidität sowie unter der Geburt ein weitgehend einheitliches Färbepild (Abb. 4.4). In der Kotyledone reagierten im Wesentlichen nur die Stromazellen und die Kapillaren der Chorionzotten schwach positiv. Vereinzelt wurden auch schwache Immunreaktionen im Zytoplasma der Trophoblastriesenzellen und der uninukleären Trophoblastzellen detektiert. Im maternalen Anteil der Plazentome konnte im Karunkelkelepitel keine Immunreaktion für IGF1 nachgewiesen werden. Im Karunkelstroma und in den dort gelegenen Kapillaren wurden IGF1-spezifische Signale in ca. 25% der Zellen

detektiert. Das deutlichste Signal wurde in den Wänden größerer, mütterlicher Blutgefäße beobachtet. In der Negativkontrolle mit einem irrelevanten polyklonalen Kaninchenantikörper (Tab. 3.12) anstelle des spezifischen Primärantikörpers ergaben sich keinerlei Farbreaktionen.

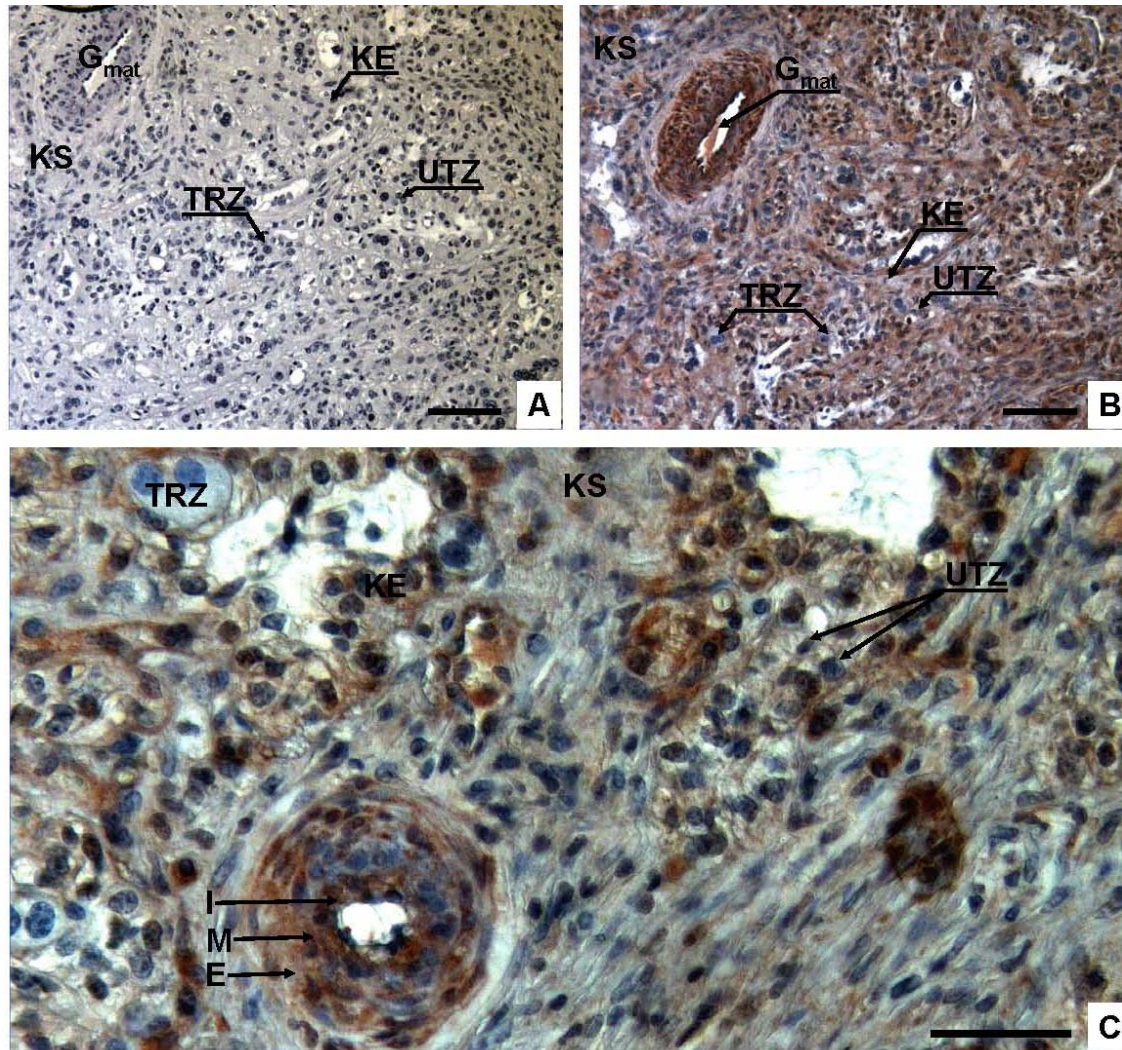


Abb. 4.4: Immunhistochemische Darstellung von IGF1 in Rinderplazentomen. A = Negativkontrolle mit irrelevantem Antikörper; B = 100fache Vergrößerung und C = 200fache Vergrößerung eines Plazentomes am Tag 230 der Gravidität. Vor allem die Gefäße in den Karunkeln sind positiv, schwache Immunsignale finden sich auch im Stroma sowie den fetalen und maternalen Kapillaren. KE = Karunkelepithel; KS = Karunkelstroma; G_{mat} = maternales Gefäß; I = Intima; M = Media; E = Externa; TRZ = Trophoblastriesenzelle; UTZ = uninukleäre Trophoblastzelle; Messbalken = 50 µm.

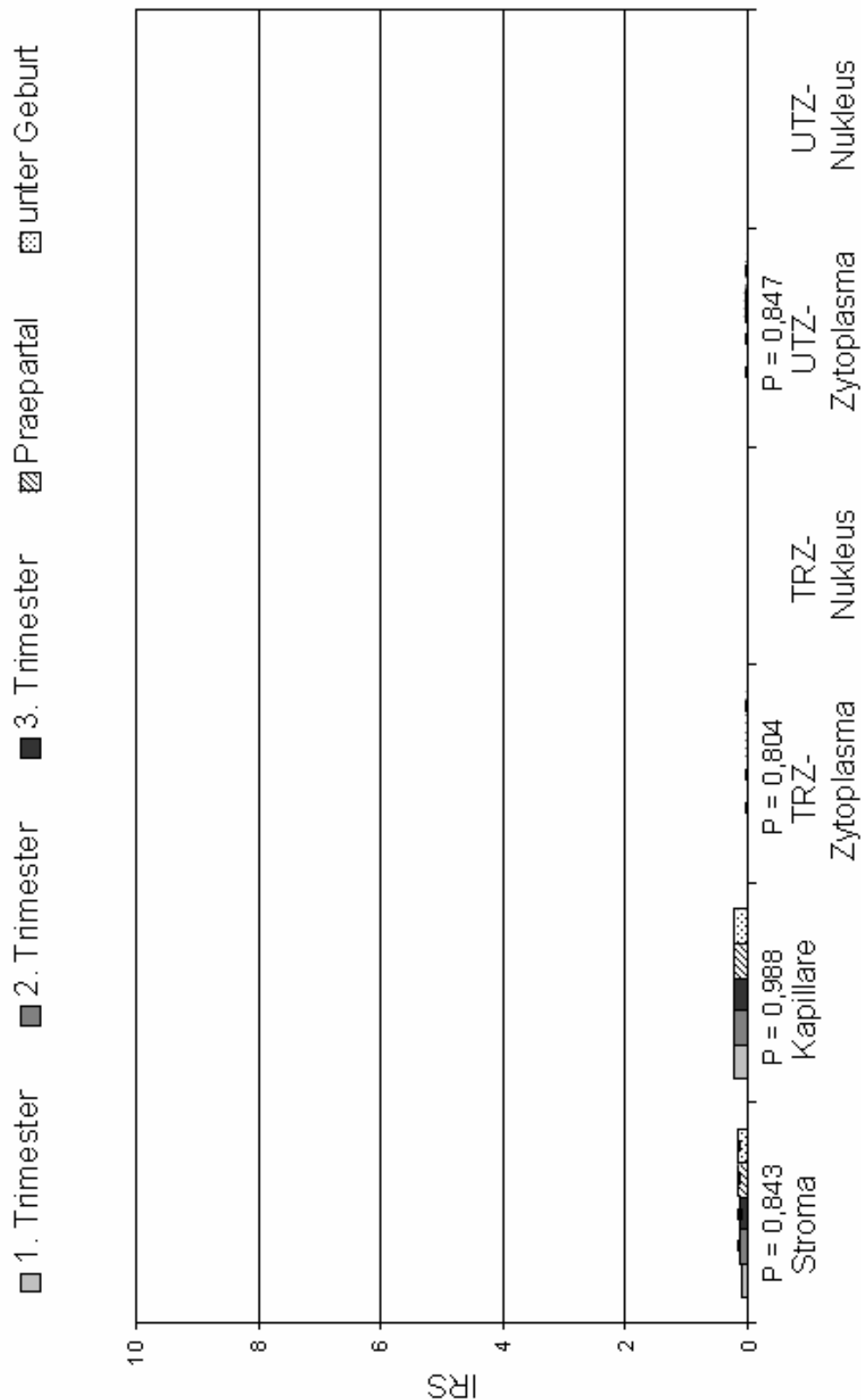


Abb. 4.5: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF1 in den Kotyledonen mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. TRZ = Trophoblastriesenzellen; UTZ = uninukleäre Trophoblastzellen.

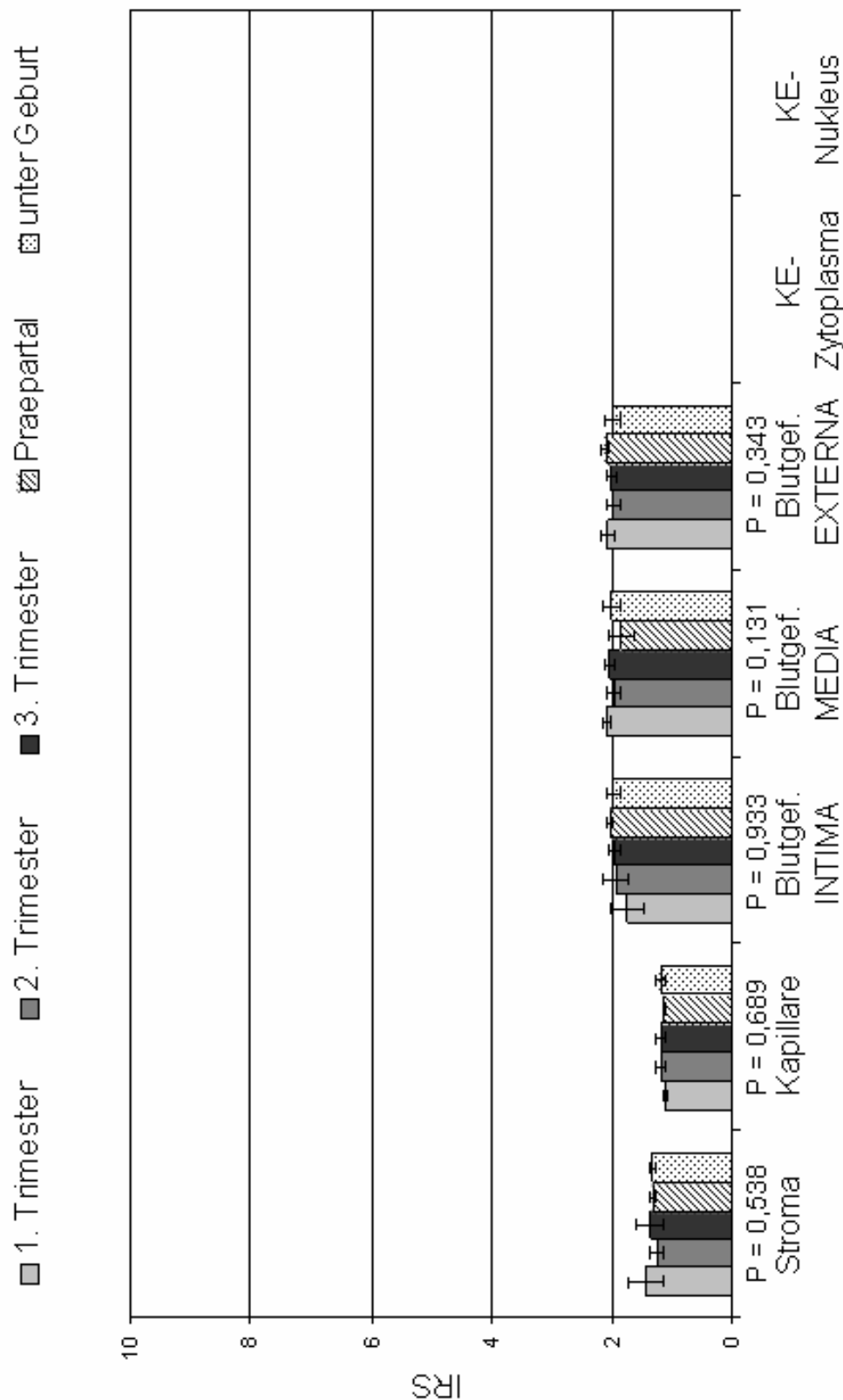


Abb. 4.6: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF1 in den Karunkeln mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. KE = Karunkel-epithel.

Bei der semiquantitativen Auswertung der Immunfärbung mittels eines immunreaktiven Scores konnte für die IGF1-Proteinexpression in den Kotyledonen (Abb. 4.5) und in den Karunkeln (Abb. 4.6) kein signifikanter Effekt der Beobachtungsgruppe ermittelt werden.

4.1.2. IGF2

4.1.2.1. Expression auf mRNA-Ebene

Die Expression von IGF2-mRNA konnte in den Rinderplazentomen mittels qualitativer RT-PCR in allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte waren in allen untersuchten Proben jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 161 bp zu sehen (Abb. 4.7).

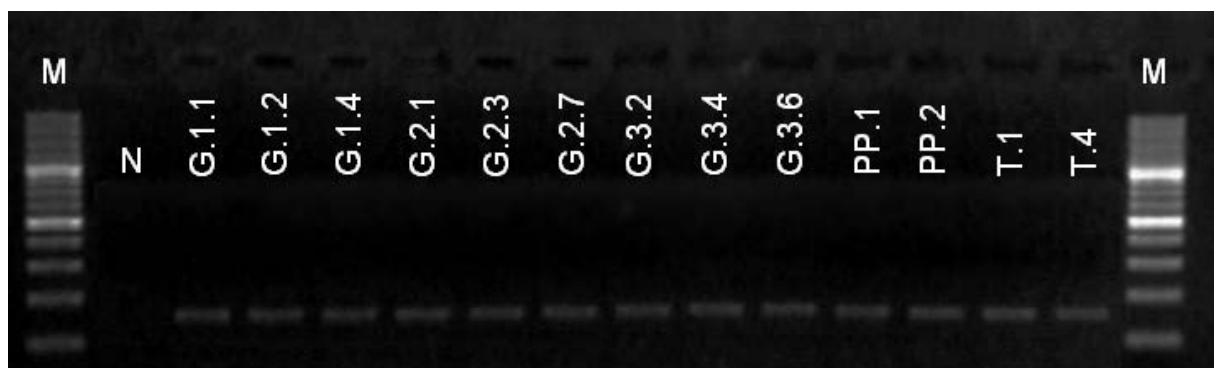


Abb. 4.7: Qualitativer Nachweis von IGF2-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 161 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen IGF2-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR in den Gesamtplazentomen zwischen dem ersten Trimester und der Geburt ergab sich ein signifikanter Zeiteffekt im Verlauf der Gravidität ($p < 0,001$, einfaktorielle ANOVA). Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher, zunächst deutlicher Anstieg der relativen Genexpression (1. Trimester: 3,0 RGE; 3. Trimester: 36,5 RGE), der sich im geburtsnahen Zeitraum (39,7 RGE) und unter der Geburt (44,2

RGE) abflachte. Das erste Trimester unterschied sich signifikant von allen anderen Beobachtungsgruppen ($p < 0,001$). Die übrigen untersuchten Stadien unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 4.8).

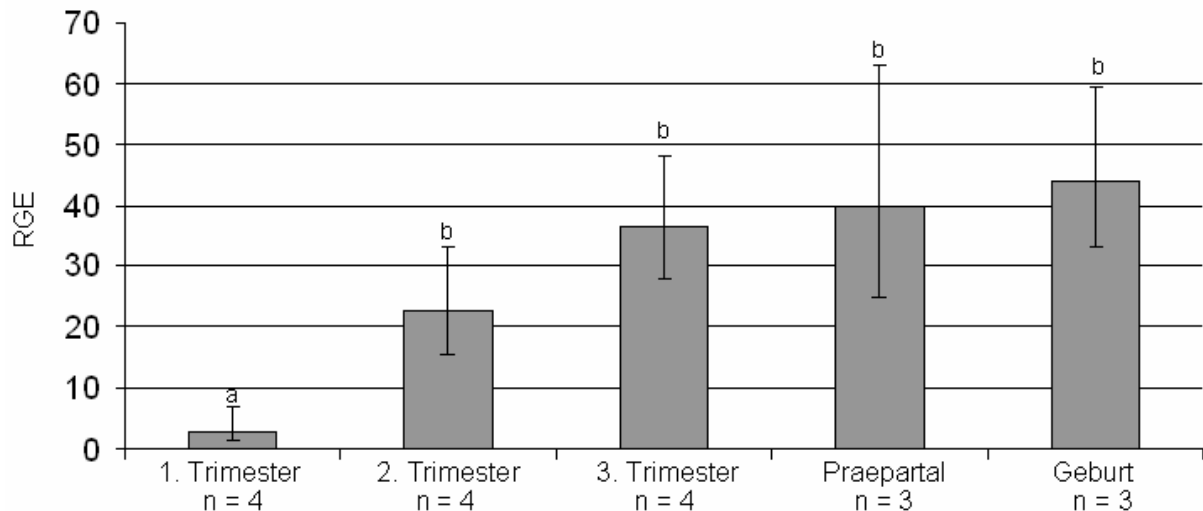


Abb. 4.8: Expression von IGF2-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p < 0,001$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. (a-b = $p < 0,001$; Tukey-Test).

Bei der separaten Messung der IGF2-mRNA-Expression in Karunkeln und Kotyledonen zwischen dem zweiten Trimester und der Geburt (Abb. 4.9) ergab sich in der zweifaktoriellen ANOVA ein signifikanter Unterschied bezüglich der Gewebeherkunft ($p < 0,001$), wobei die Expression unabhängig von der Beobachtungsgruppe im fetalen Teil der Plazentome höher war als im maternalen. Entsprechend war die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft (fetal bzw. maternal) nicht signifikant ($p = 0,183$). Der fetale Anteil des Plazentoms wies zwischen dem ersten Trimester und der Geburt einen kontinuierlichen Anstieg der IGF2-Expression von 35,1 RGE bis 101,1 RGE auf (Abb. 4.9), wohingegen der Anstieg in der Karunkel nur sehr schwach ausgeprägt war (10,0 RGE bis 23,4 RGE). Der Einfluss der Beobachtungsgruppe erwies sich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse jedoch als nicht signifikant ($p = 0,115$).

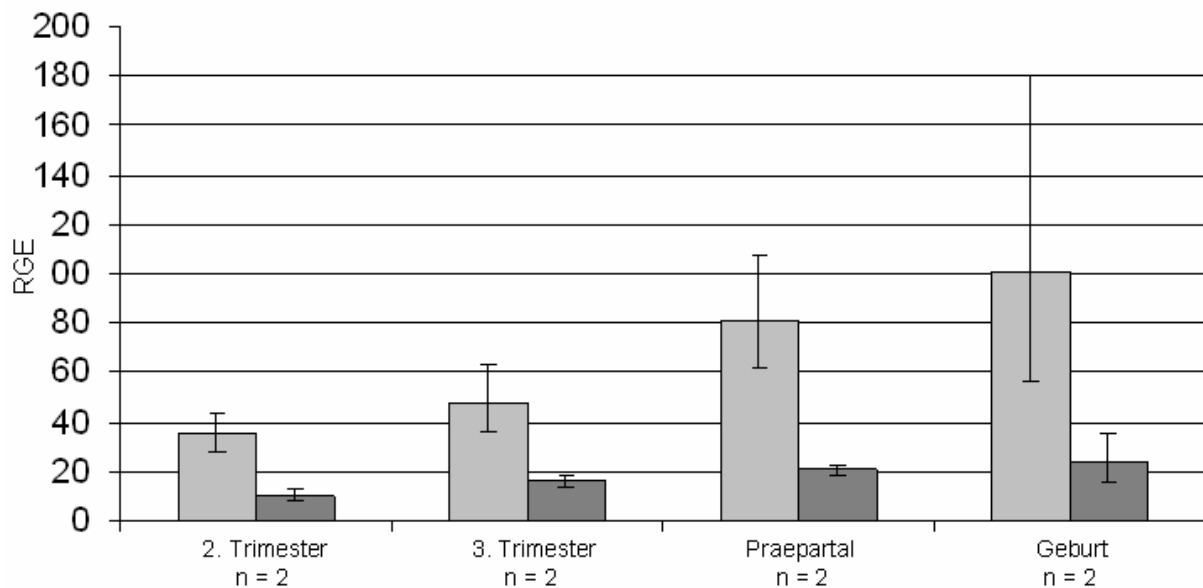


Abb. 4.9: Expression von IGF2-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p < 0,001$), während der Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,115$) und die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,183$) nicht signifikant waren.

4.1.2.2. Expression auf Proteinebene

IGF2 wurde im maternalen Anteil der Plazentome vor allem im Gefäßsystem nachgewiesen (Abb. 4.10). Positive Signale fanden sich in der Externa und der Media größerer Gefäße, jedoch nicht in der Intima. Auch die Kapillaren waren spezifisch gefärbt. Das Karunkelstroma wies in allen Plazentomen einheitliche zytoplasmatische Immunsignale auf. Im Karunkelepithel konnte IGF2 nicht detektiert werden. Im fetalen Anteil der Plazentome fanden sich wie in der Karunkel Signale im Stroma und assoziiert mit den Kapillaren. In den Trophoblastriesenzellen und in den uninukleären Trophoblastzellen war IGF2 vereinzelt im Zytoplasma, aber nicht im Nukleus nachweisbar. In der Negativkontrolle mit einem irrelevanten polyklonalen Kaninchenantikörper (Tab. 3.12) anstelle des spezifischen Primärantikörpers ergaben sich keinerlei Farbreaktionen.

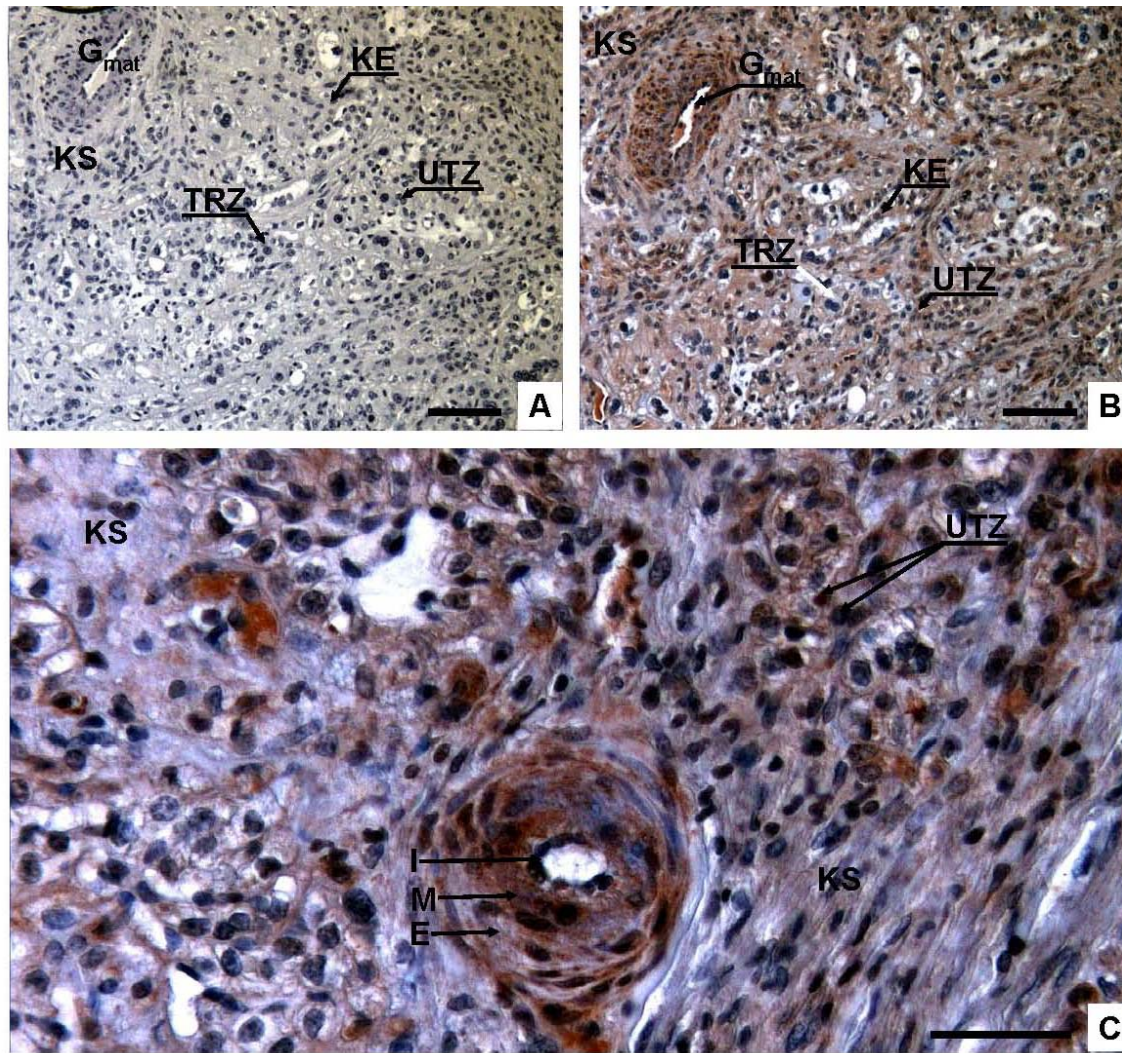


Abb. 4.10: Immunhistochemische Darstellung von IGF2 in Rinderplazentomen. A = Negativkontrolle mit irrelevantem Antikörper; B = 100fache Vergrößerung und C = 200fache Vergrößerung eines Plazentomes am Tag 230 der Gravidität. Vor allem die größeren Gefäße in den Karunkeln sind positiv, schwache Immunsignale finden sich auch im Stroma sowie in den fetalen und maternalen Kapillaren. KE = Karunkel­epithel; KS = Karunkelstroma; G_{mat} = maternales Gefäß; I = Intima; M = Media; E = Externa; TRZ = Trophoblastriesenzelle; UTZ = uninukleäre Trophoblastzelle; Messbalken = 50 µm.

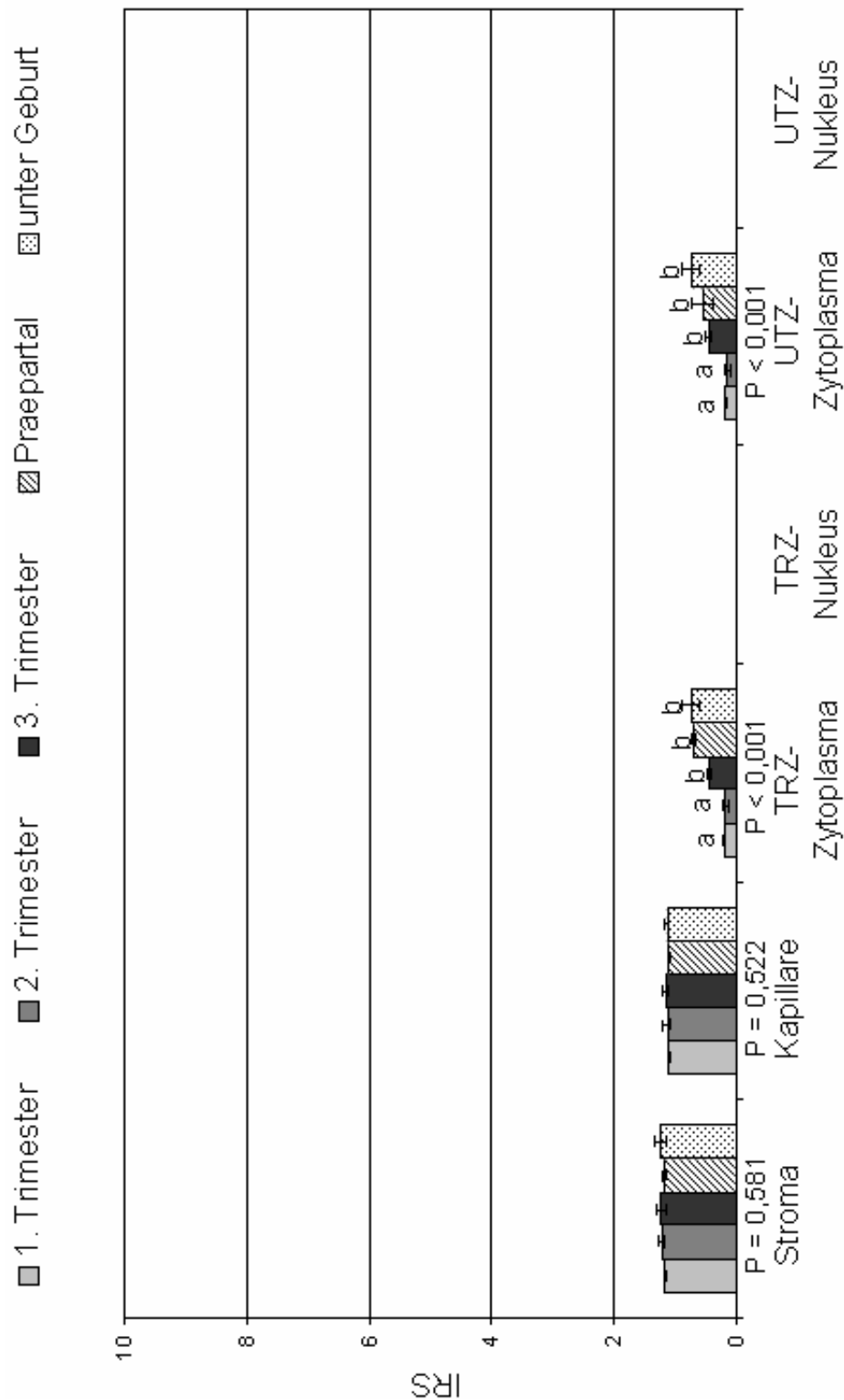


Abb. 4.11: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF2 in den Kotyledonen mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. TRZ = Trophoblastriesenzellen; UTZ = uninukleäre Trophoblastzellen. Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. ($p < 0,05$; Tukey-Test).

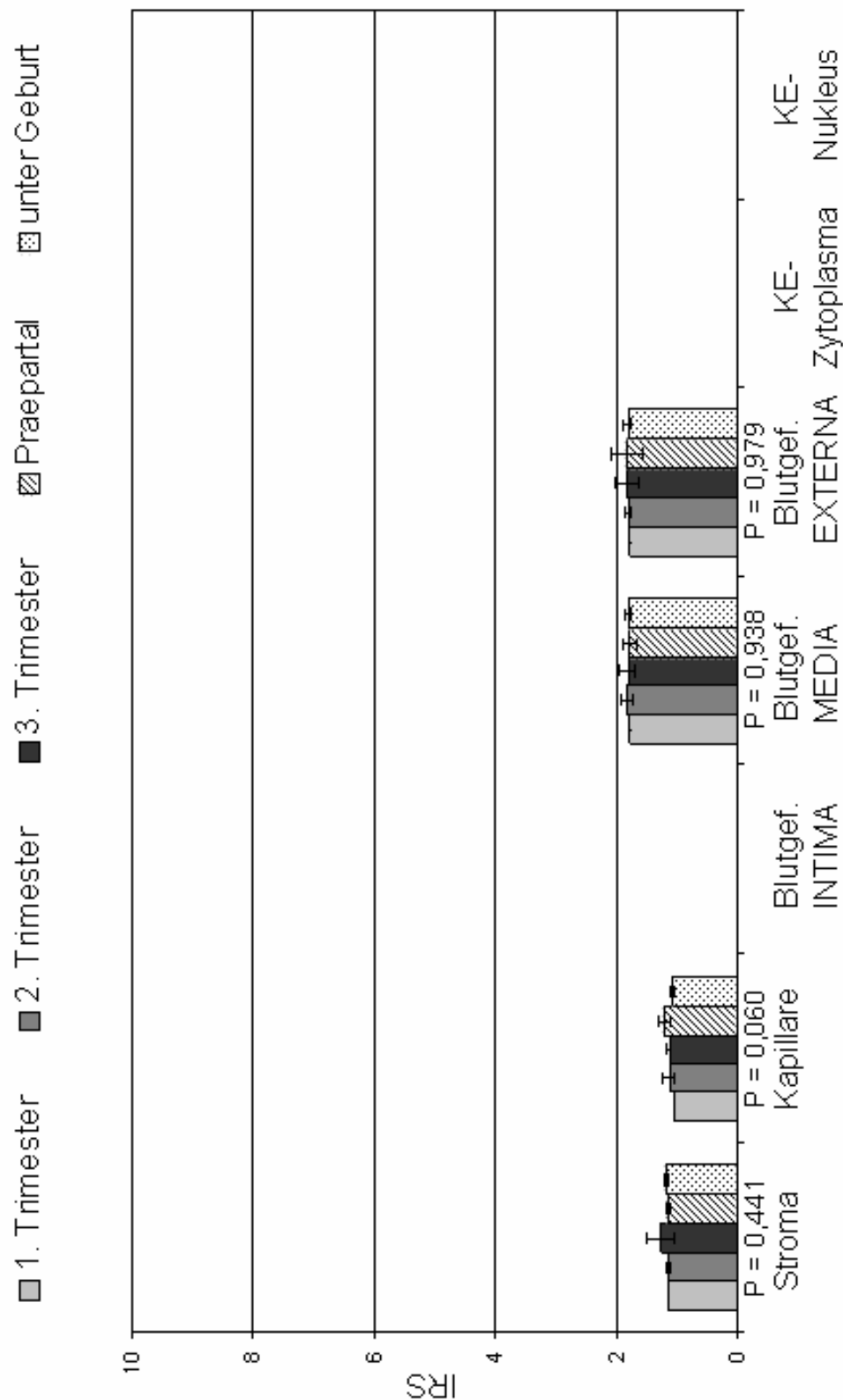


Abb. 4.12: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF2 in den Karunkeln mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. KE = Karunkelepithel.

Die semiquantitative Erfassung der IGF2-Expression mittels eines immunreaktiven Score (IRS) ergab für die Trophoblastzellen einen signifikanten Zeiteffekt ($p < 0,001$; Abb. 4.11). In den Trophoblastriesenzellen konnte im ersten Trimester ein IRS von 0,2 ermittelt werden. Dieser Wert stieg bis unter der Geburt auf 0,7 an. Einen praktisch identischen Verlauf hatte der immunreaktive Score in den uninukleären Trophoblastzellen mit einem Minimum von 0,1 im zweiten Trimester und einem Maximum von 0,7 unter der Geburt ($p < 0,001$). Für das IGF2-spezifische Signal im fetalen Stroma und im fetalen Kapillarsystem konnte kein signifikanter Zeiteffekt ermittelt werden, in beiden Fällen lagen unabhängig von der Beobachtungsgruppe die IRS-Werte knapp über 1,0. Ähnliche IRS-Werte konnten für das Karunkelstroma und die dort eingebetteten Kapillaren ermittelt werden (Abb. 4.12). Die IRS-Werte für die Media und die Intima der großen maternalen Blutgefäße waren etwas höher und lagen knapp unter 2. Ein signifikanter Effekt der Beobachtungsgruppe war für keinen der in der Karunkel erfassten Zelltypen nachweisbar.

4.1.3. IGF1-R

4.1.3.1. Expression auf mRNA-Ebene

Mittels konventioneller RT-PCR konnte in den Rinderplazentomen die Expression von IGF1-R-mRNA qualitativ in allen untersuchten Stadien der Gravidität sowie unter der Geburt nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Banden in der erwarteten Größe von 192 bp zu sehen (Abb. 4.13).

Für die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Expression der IGF1-R-mRNA in den Gesamtplazentomen konnte im Verlauf der Gravidität ein signifikanter Zeiteffekt ($p = 0,001$; einfaktorielle ANOVA) ermittelt werden. Die mittlere relative Genexpression lag im ersten Trimester bei 6,3 und sank im zweiten auf 1,4 ab. Im weiteren Verlauf stiegen die mittleren RGE-Werte von 3,4 im dritten Trimester wieder auf 6,7 (Präpartal) bzw. 6,3 RGE (unter der Geburt) an. Das zweite Trimester unterschied sich signifikant ($p < 0,01$) von allen anderen untersuchten Stadien, exklusiv dem dritten Trimester (Abb. 4.14).

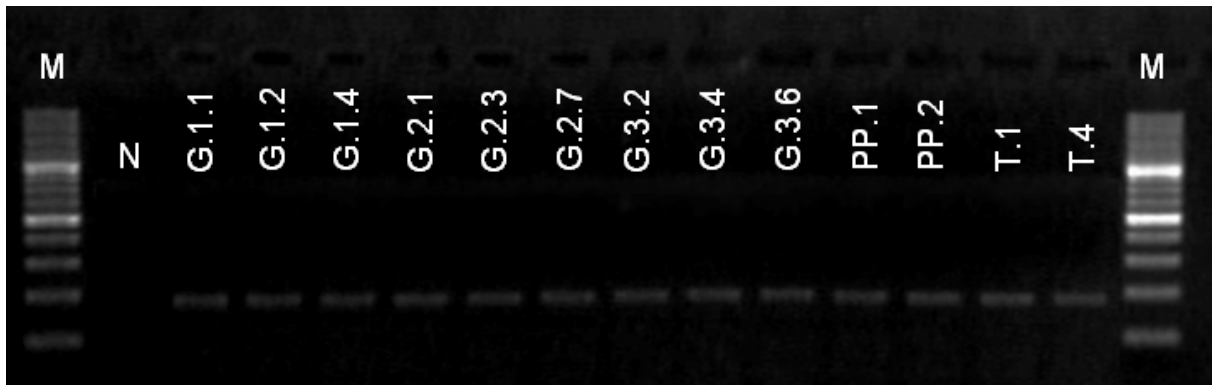


Abb. 4.13: Qualitativer Nachweis von IGF1-R-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 192 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

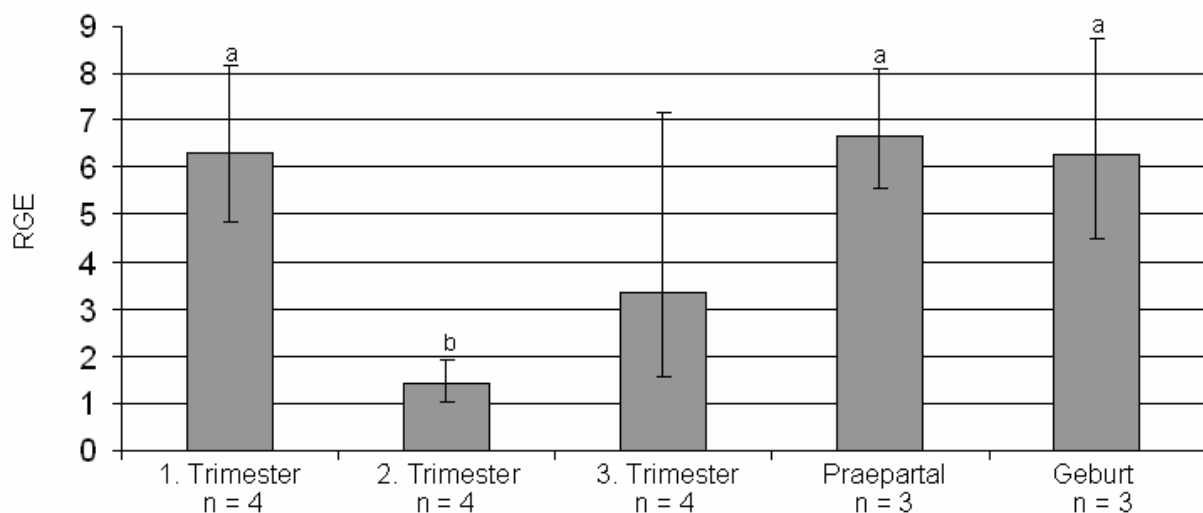


Abb. 4.14: Expression von IGF1-R-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,001$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. (a-b = $p < 0,01$; Tukey-Test).

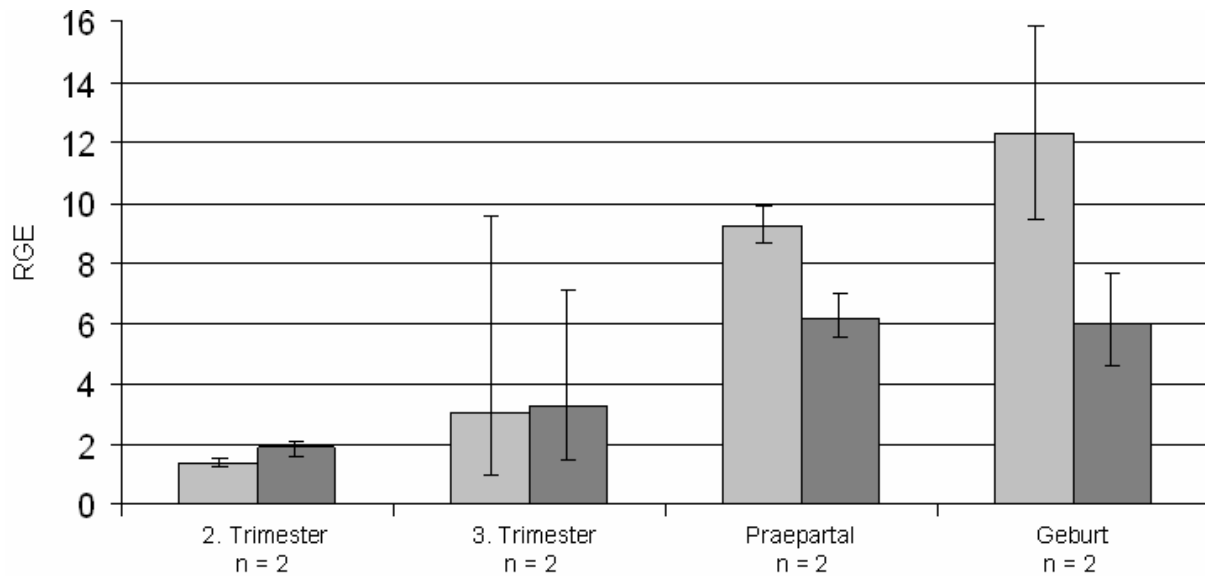


Abb. 4.15: Expression von IGF1-R-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,162$), während der Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,072$) und die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,092$) statistisch auffällig waren.

Bei der separaten Messung der IGF1-R-mRNA-Expression in Kotyledone und Karunkel wurde zwischen dem zweiten Trimester und der Geburt in der zweifaktoriellen ANOVA eine Signifikanz für die Beobachtungsgruppe verfehlt, ihr Effekt war jedoch statistisch auffällig ($p = 0,072$). Für die Herkunft des Probenmaterials – Kotyledone bzw. Karunkel – ergab sich keine Signifikanz ($p = 0,162$). Die Wechselwirkung ist statistisch auffällig ($p = 0,092$). Die Expression der IGF1-R-mRNA in der Kotyledone stieg kontinuierlich vom zweiten Trimester (mittlerer RGE-Wert 1,4) bis zur Geburt (12,3) an. Auch in der Karunkel war ein anfänglicher Anstieg zu erkennen, dieser flachte sich unter der Geburt ab (Abb. 4.15).

4.1.3.2. Expression auf Proteinebene

Bei der immunhistochemischen Darstellung von IGF1-R mittels zweier polyklonaler Kaninchenantikörper gegen den C-Terminus der humanen IGF1-R α -Untereinheit bzw. den N-Terminus der humanen IGF1-R β -Untereinheit (Tab. 3.12) ergaben sich zu allen untersuchten Trächtigkeitsphasen sowie unter der Geburt zwei

weitgehend einheitliche, vorwiegend gefäßassoziierte Färbemuster (Abb. 4.16). Sie unterschieden sich nur in der Intensität der Immunreaktionen in Intima und Media der großen maternalen Gefäße. In der Media wies die α -Untereinheit die stärkste Immunreaktion auf, wohingegen die Signale für die β -Untereinheit in der Intima am stärksten lokalisiert waren. Die Externa der großen Gefäße reagierte für beide Untereinheiten nur schwach positiv. Im maternalen Stroma reagierten alle Zellen schwach positiv und nur vereinzelt fanden sich Stromazellen mit einer mittleren Signalstärke. Deutlich waren im Karunkelstroma die Kapillaren erkennbar, die eine starke Färbereaktion gegen beide Untereinheiten aufwiesen. In den fetalen Kapillaren konnten für beide Untereinheiten deutliche Immunsignale ausgemacht werden. Schwach reagierte das fetale Stroma, hier zeigten nur vereinzelnde Zellen eine Färbereaktion. Mit beiden verwendeten Antikörpern fand sich jeweils in ca. 10% der Trophoblastriesenzellen sowie in ca. 5% der einkernigen Trophoblastzellen ein zytoplasmatisches Signal, die Nuklei waren immunhistochemisch negativ. In der Negativkontrolle wurden mit einem irrelevanten polyklonalen Kaninchenantikörper (Tab. 3.12) anstelle des spezifischen Primärantikörpers keine Farbreaktionen detektiert.

Bei den semiquantitativen Auswertungen der Immunfärbung mittels eines immunreaktiven Scores konnten für beide IGF1-R Untereinheiten in der Kotyledone (Abb. 4.17a und 4.17.b) sowie in der Karunkel (Abb. 4.18a und 4.18b) keine signifikanten Effekte der Beobachtungsgruppen ermittelt werden.

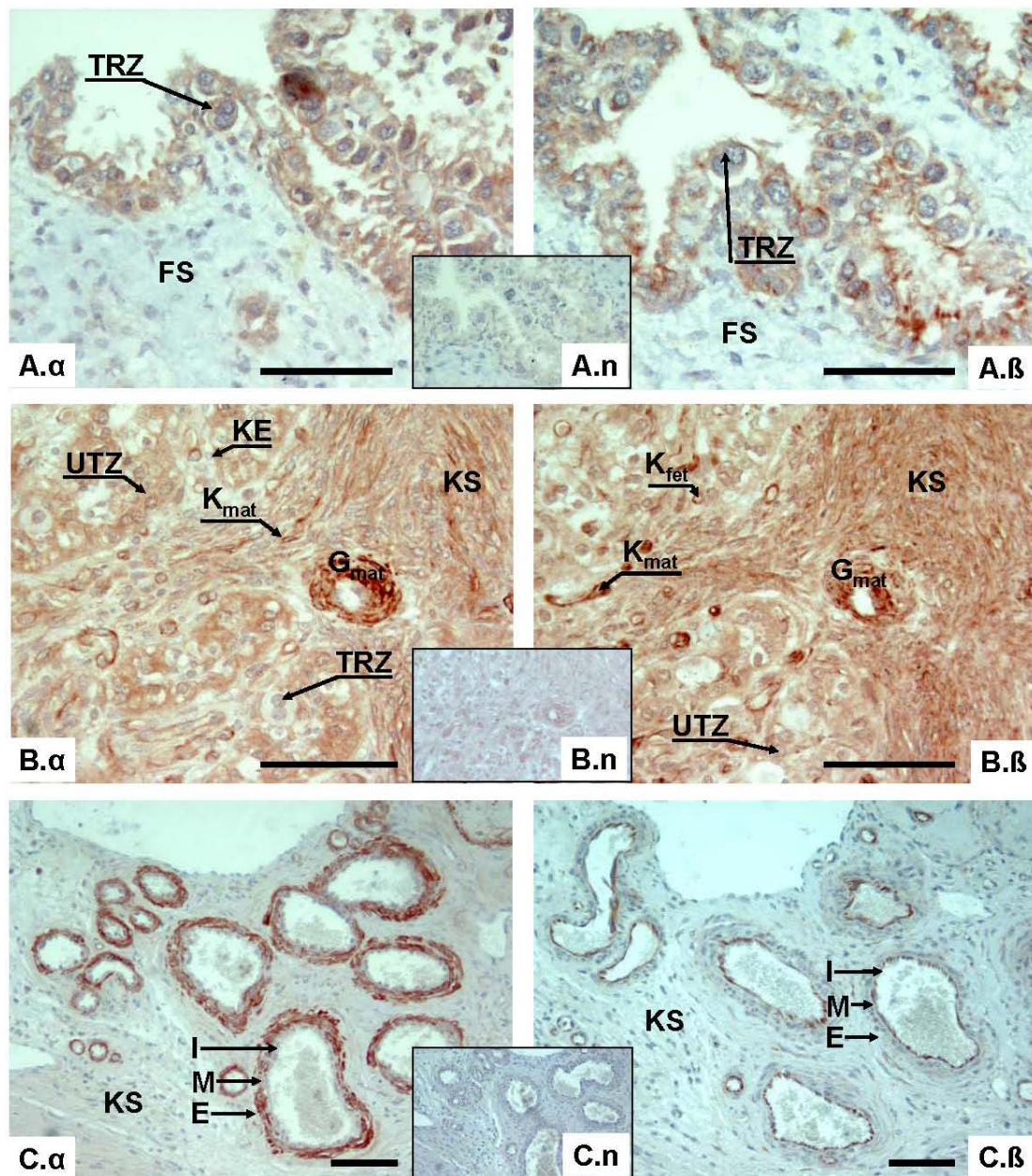


Abb. 4.16: Immunhistochemische Darstellung von IGF1-R in Rinderplazentomen. A = Chorionplatte; B = Plazentommitte; C = Karunkelstiel am Tag 140 der Gravidität; α = Alpha-Untereinheit des IGF1-R; β = Beta-Untereinheit des IGF1-R; n = Negativkontrolle mit irrelevantem Antikörper. Die Interdigitationszone weist Immunreaktionen im Zytoplasma der Trophoblastzellen auf. In der Plazentommitte finden sich vor allem in den fetalen und maternalen Kapillaren deutliche Immunsignale. Größere maternale Gefäße sind sowohl in der Plazentommitte und im Karunkelstiel deutlich gefärbt. KE = Karunkelepithel; KS = Karunkelstroma; K_{mat} = maternale Kapillare; G_{mat} = maternales Gefäß; I = Intima; M = Media; E = Externa; FS = fetales Stroma; K_{ft} = fetale Kapillare; TRZ = Trophoblastriesenzelle; UTZ = uninukleäre Trophoblastzelle; Messbalken = 50 μ m.

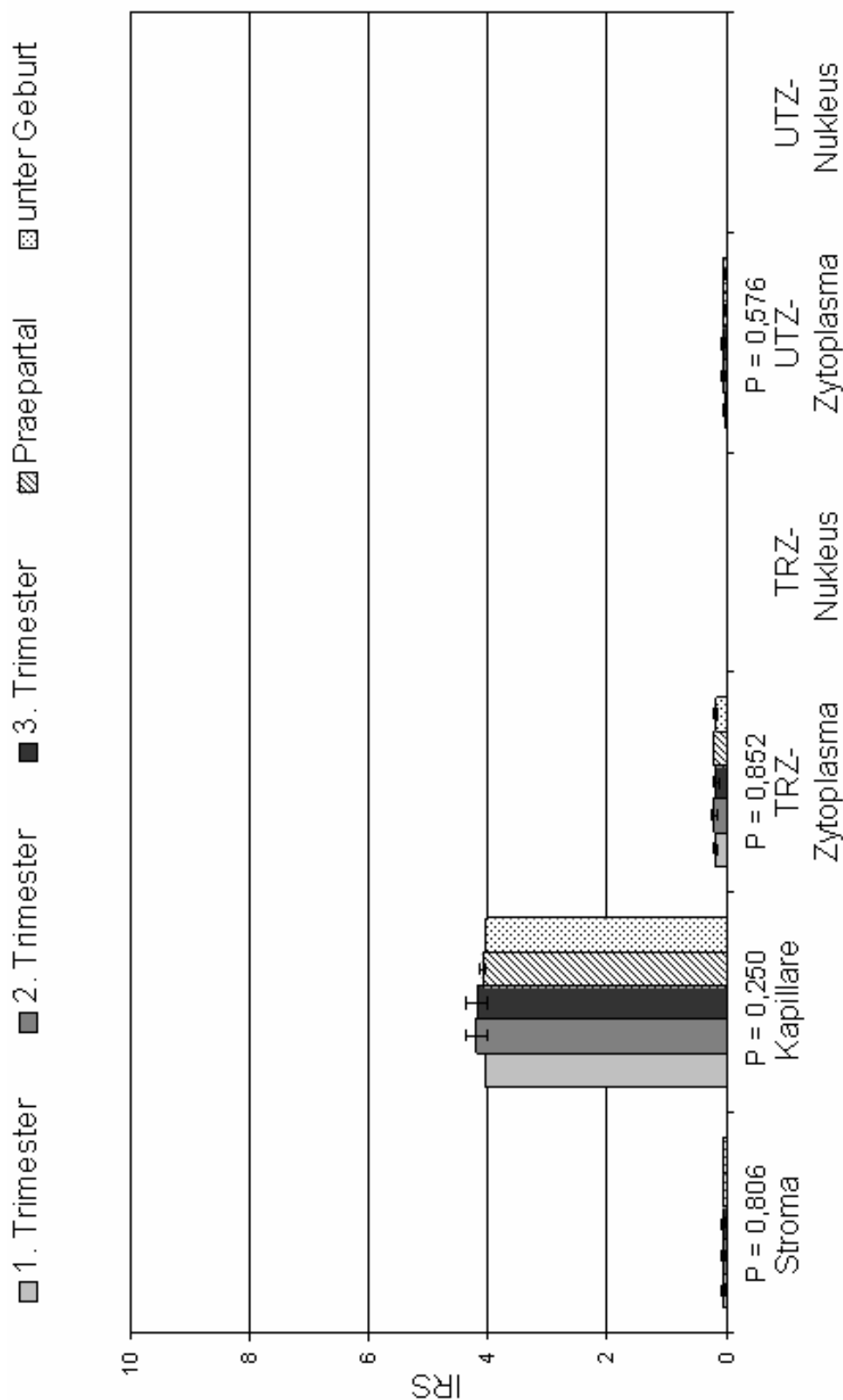


Abb. 4.17a: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für die IGF1-R α -Untereinheit in den Kotyledonen mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. TRZ = Trophoblastriesenzellen; UTZ = uninukleäre Trophoblastzellen.

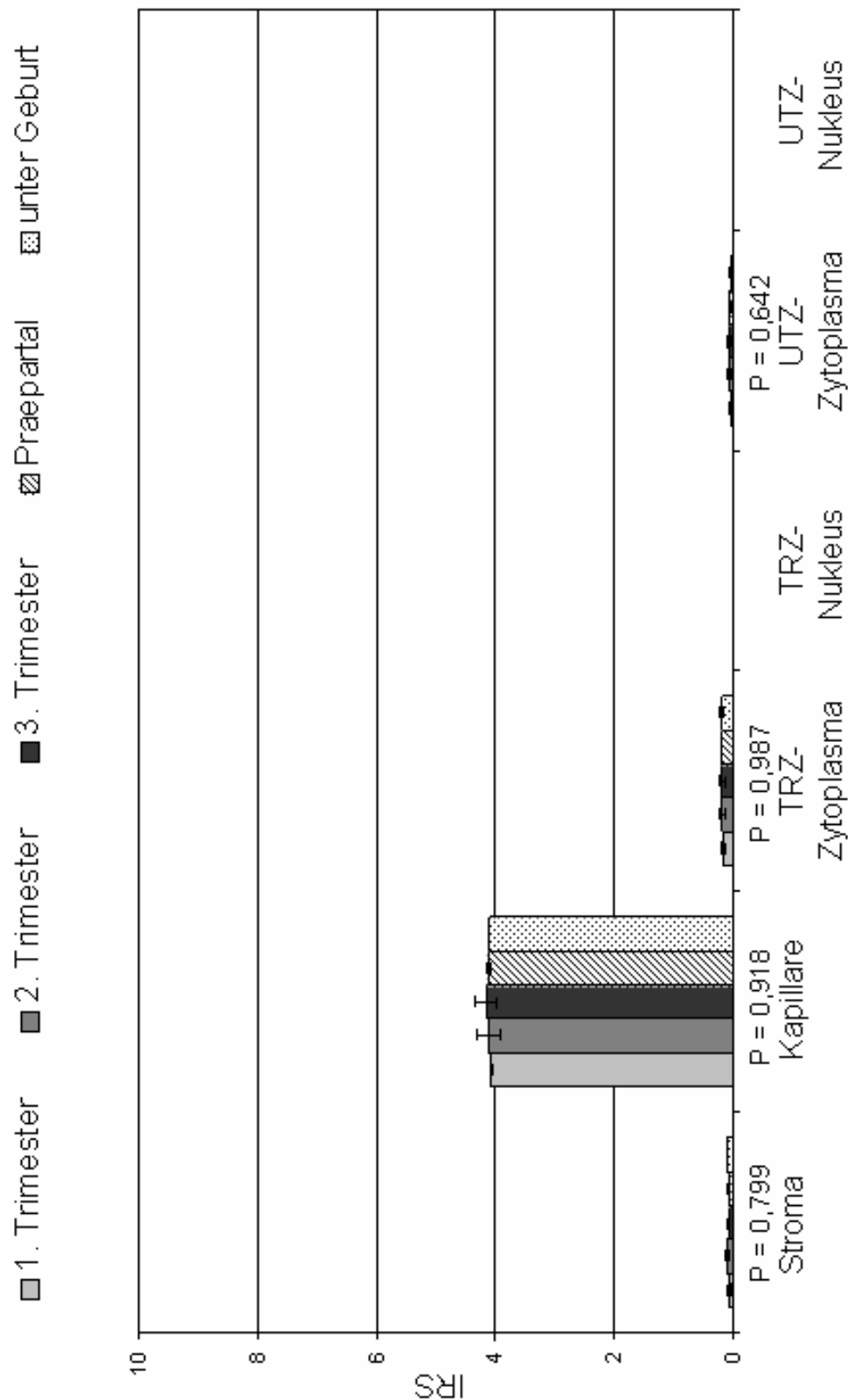


Abb. 4.17b: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für die IGF1-R β -Untereinheit in den Kotyledonen mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. TRZ = Trophoblastriesenzellen; UTZ = uninukleäre Trophoblastzellen.

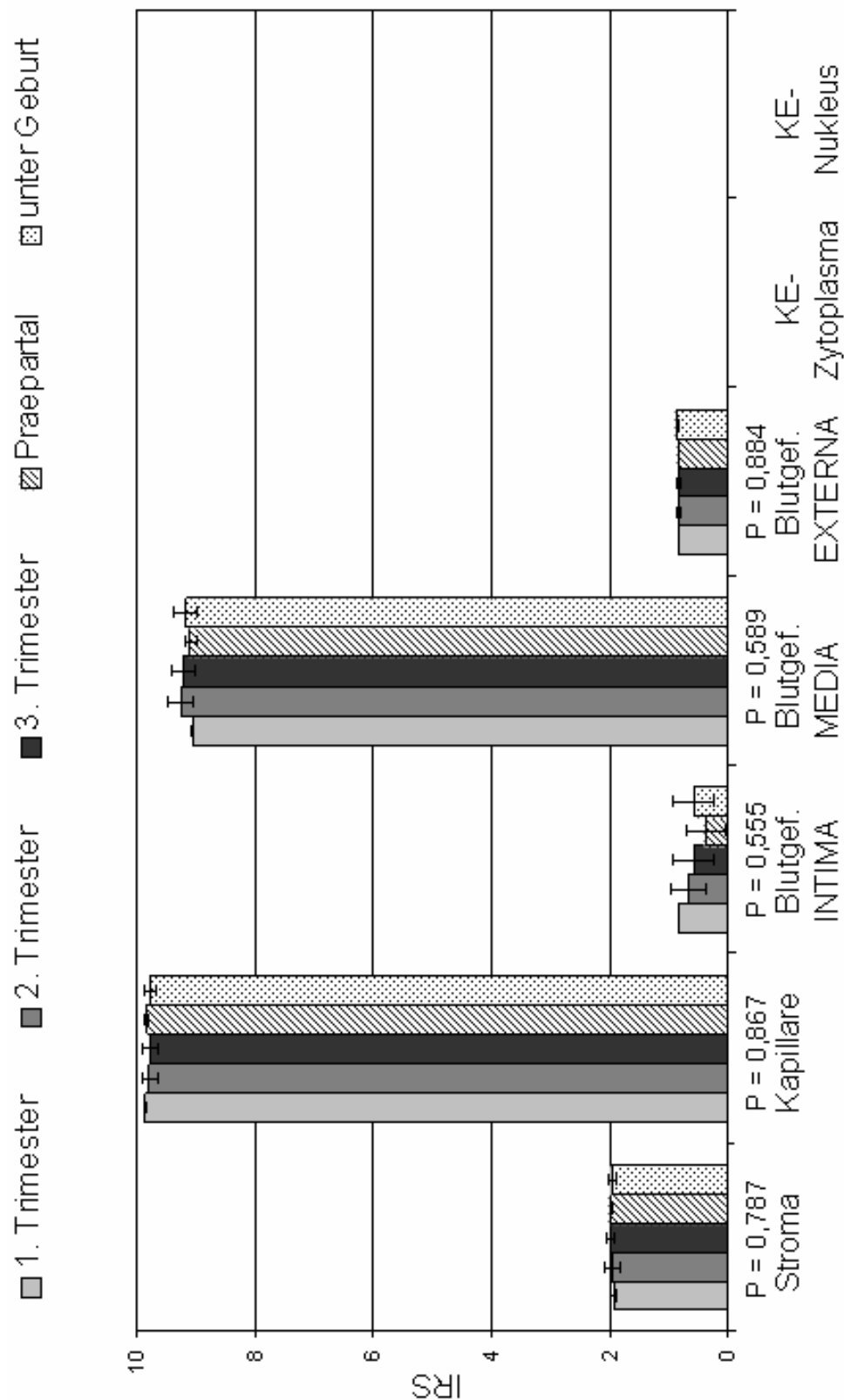


Abb. 4.18a: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für die IGF1-R α -Untereinheit in den Karunkeln mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. KE = Karunkelepithel.

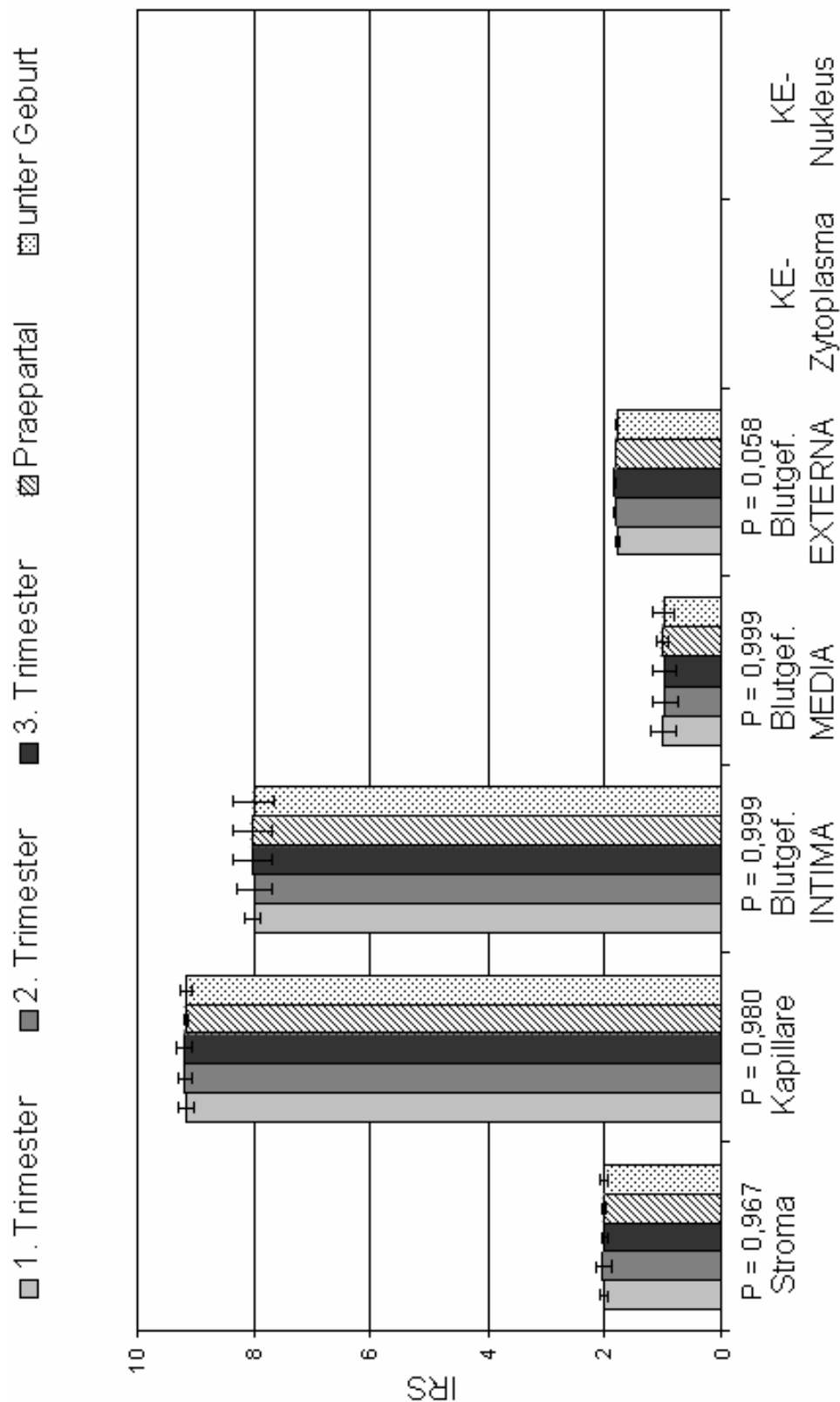


Abb. 4.18b: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für die IGF1-R β -Untereinheit in den Karunkeln mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. KE = Karunkelepithel.

4.1.4. IGF2-R

4.1.4.1. Expression auf mRNA-Ebene

Die Expression von IGF2-R-mRNA konnte in den Rinderplazentomen mittels qualitativer RT-PCR in allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte waren in allen untersuchten Proben jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 378 bp zu sehen (Abb. 4.19).

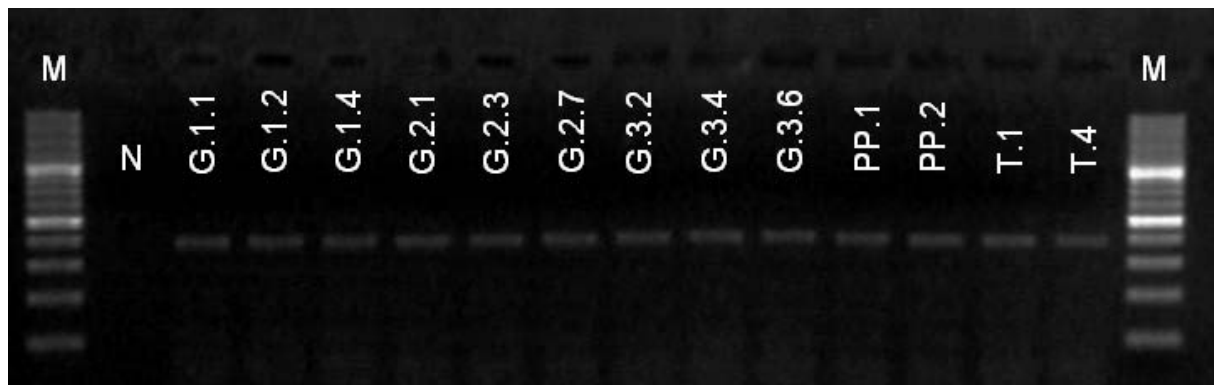


Abb. 4.19: Qualitativer Nachweis von IGF2-R-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 378 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Gravitationsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen IGF2-R-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR in den Gesamtplazentomen ergab die einfaktorielle Varianzanalyse keinen signifikanten Zeiteffekt ($p = 0,706$). Im Mittel wies das 1. Trimester mit 1,5 RGE das Minimum und das 3. Trimester mit 2,7 das Maximum in der Expression auf (Abb. 4.20).

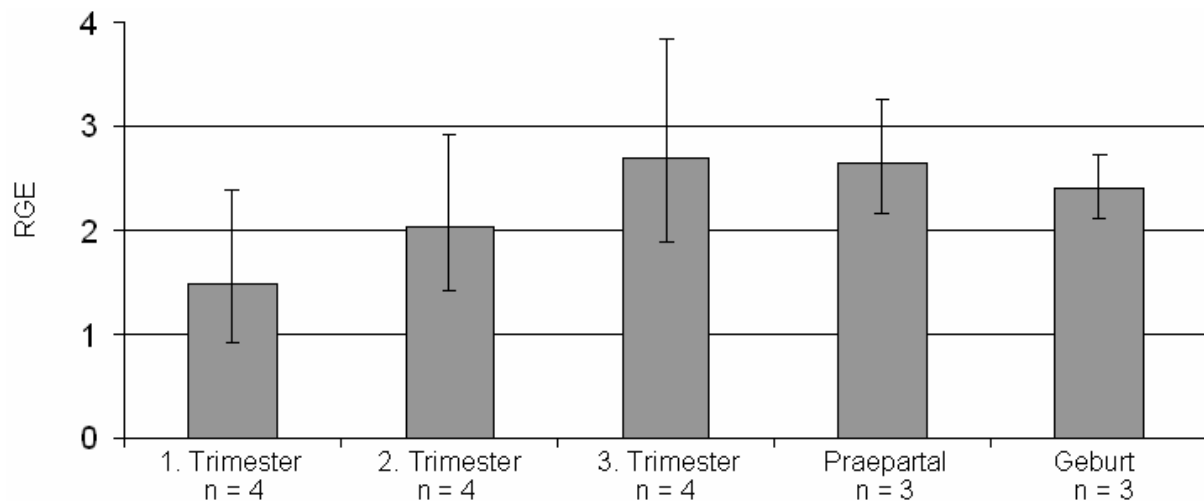


Abb. 4.20: Expression von IGF2-R-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,706$).

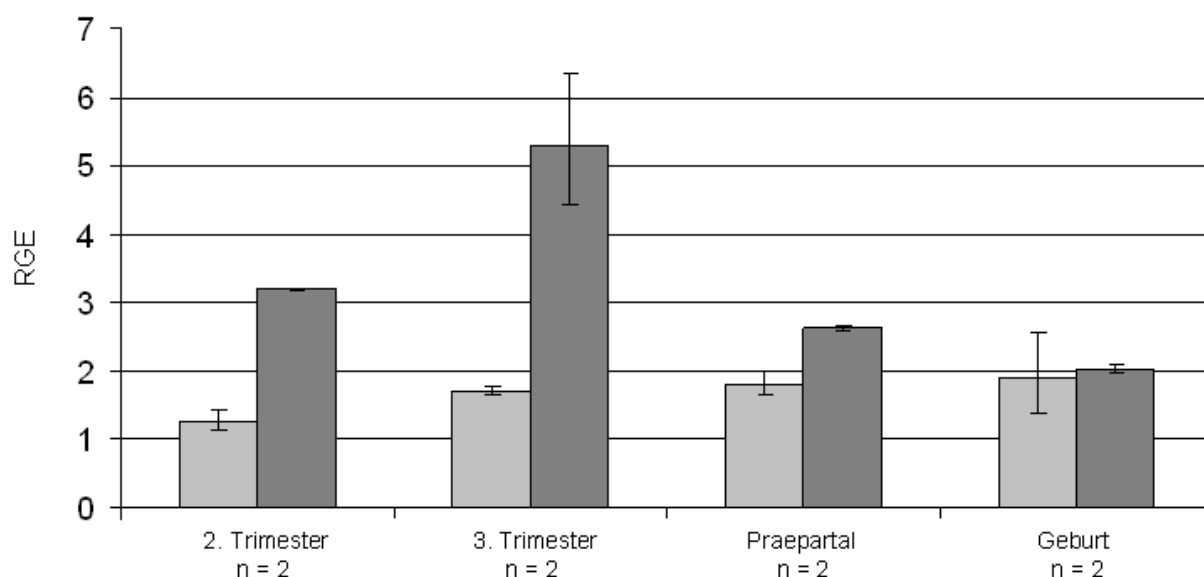


Abb. 4.21: Expression von IGF2-R-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,001$), der Beobachtungsgruppe ($p = 0,035$) sowie eine signifikante Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,015$).

Bei der separaten Messung der IGF2-R-mRNA in Kotyledone und Karunkel zwischen dem zweiten Trimester und der Geburt ergab die zweifaktorielle ANOVA einen signifikanten Unterschied ($p = 0,001$) bezüglich der Gewebeherkunft, wobei die Expression unabhängig von der Beobachtungsgruppe im fetalen Teil der Plazentome niedriger war als im maternalen. Der Einfluss der Beobachtungsgruppe erwies sich ebenfalls als signifikant ($p = 0,035$). Auch die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft war signifikant ($p = 0,015$). Im fetalen Anteil des Plazentomes stieg die IGF2-R-Expression geringfügig von 1,3 RGE im zweiten Trimester auf 1,9 RGE unter der Geburt an. In der Karunkel wies das dritte Trimester ein Maximum (5,3 RGE) auf, die anderen untersuchten Stadien lagen zwischen 3,2 RGE im zweiten Trimester und 2,0 RGE unter der Geburt (Abb. 4.21).

4.1.4.2. Expression auf Proteinebene

Bei der immunhistochemischen Darstellung von IGF2-R mittels monoklonalem Kaninchenantikörper gegen die extracytoplasmatische Domäne des bovinen kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptors/IGF2-R (Tab. 3.12) ergab sich ein Beobachtungsgruppen-abhängiges Färbemuster (Abb. 4.22). Bis zum Eintritt der präpartalen Luteolyse waren die Immunreaktionen gegen IGF2-R weitgehend konstant. Das Karunkel epithel reagierte in diesen Stadien positiv im Zytoplasma, die Nuklei waren negativ. Vereinzelt wurden schwache Immunsignale im Karunkelstroma detektiert, welches aber zum Großteil negativ war. Die im Karunkelstroma eingebetteten Kapillaren waren stark positiv gefärbt, wohingegen größere Gefäße im Karunkelstiel nur schwach positiv bis negativ waren. Im fetalen Anteil des Plazentoms konnte im Stroma eine deutliche Färbung für IGF2-R nachgewiesen werden, noch stärker war diese in den fetalen Kapillaren zu erkennen. 90% der Trophoblastriesenzellen zeigten eine negative, der Rest eine schwache bis mittelgradige zytoplasmatische Immunreaktion. In den uninukleären Trophoblastzellen wurden keine IGF2-R-spezifischen Signale im Zytoplasma detektiert. Eine nukleäre Immunreaktion wurde in diesen Zellen jedoch ab Mitte des dritten Trimester beobachtet.

Im präpartalen Zeitraum und unter der Geburt wurden die Immunreaktionen gegen IGF2-R im Karunkelstroma stärker, in den maternalen Kapillaren jedoch schwächer. Eine Abnahme der Färbeintensität wurde unter der Geburt im Zytoplasma des Karunkel epithels gefunden. Die in der Mitte des dritten Trimesters

auf tretenden nukleären IGF2-R-spezifischen Signale der uninukleären Trophoblastzellen wurden in diesen Beobachtungsgruppen stärker, zusätzlich konnten auch zytoplasmatische Signale detektiert werden.

Die semiquantitative Erfassung der IGF2-R-Expression mittels immunreaktiven Score (IRS) ergab für uninukleäre Trophoblastzellen im Zytoplasma und im Nukleus einen signifikanten Zeiteffekt im Verlauf der Trächtigkeit (jeweils $p < 0,001$). Im Zytoplasma konnte vor Beginn der Luteolyse ein IRS von $< 0,1$ ermittelt werden. Dieser Wert stieg in den Beobachtungsgruppen „Präpartal“ und unter der Geburt auf 1,1 bzw. 1,0 an. Dieser Anstieg ist signifikant ($< 0,001$). In den uninukleären Trophoblastzellen konnten nukleäre Immunsig nale für IGF2-R erst ab dem dritten Trimester (1,3 mittlerer IRS-Wert) beobachtet werden, die präpartal und unter der Geburt auf 4,7 bzw. 4,8 mittlerer IRS-Wert anstiegen, dieser Anstieg ist signifikant ($p < 0,001$). Für alle anderen Zelltypen in der Kötyledone konnte kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe festgestellt werden (Abb. 4.23). Die semiquantitative Auswertung in den Karunkeln ergab für Stroma, Kapillaren und Epithel jeweils einen signifikanten Zeiteffekt ($p < 0,001$; Abb. 4.24). Im Karunkelstroma konnte ein Maximum (0,7 IRS) der IGF2-R-Expression im Geburtszeitraum ermittelt werden, welches sich signifikant ($p < 0,001$) von den Gruppen erstes, zweites bzw. drittes Trimester unterschied. IGF2-R-spezifische Signale verringerten sich im Karunkelepithel signifikant unter der Geburt, dieses konnte bei den Kapillaren schon ab dem präpartalen Stadium beobachtet werden, ($p < 0,001$). Auch für die Intima und Media in den maternalen Blutgefäßen konnte ein signifikanter Zeiteffekt der Beobachtungsgruppe ermittelt werden ($p = 0,038$ bzw. $p = 0,030$). In der Negativkontrolle mit einem irrelevanten monoklonalen Kaninchenantikörper (Tab. 3.12) anstelle des spezifischen Primärantikörpers ergaben sich keinerlei Farbreaktionen.

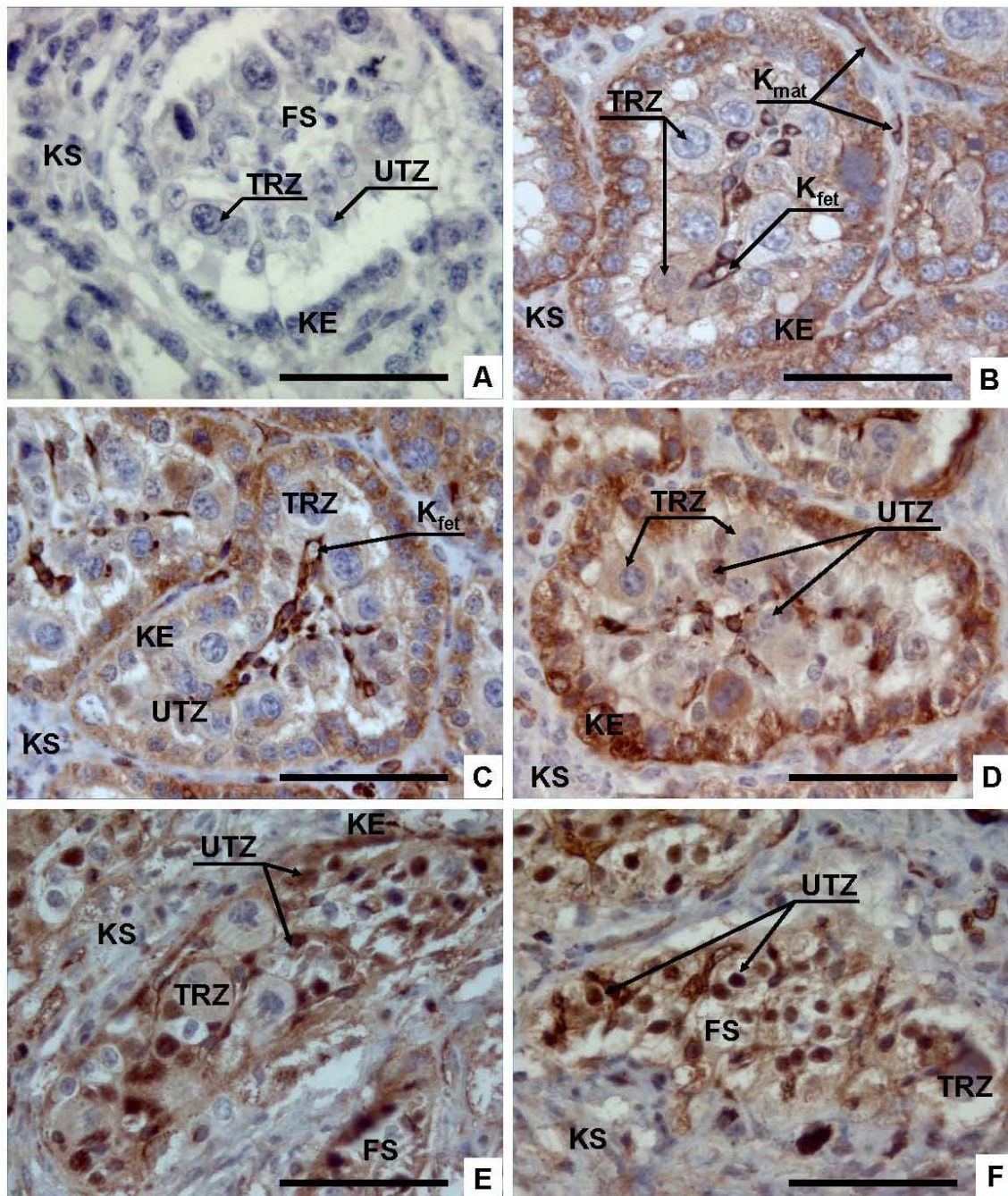


Abb. 4.22: Immunhistochemische Darstellung von IGF2-R im Rinderplazentom. A = Negativkontrolle mit irrelevantem Antikörper; B = 80. Tag; C = 160. Tag; D = 230. Tag der Gravidität; E = präpartal; F = unter der Geburt. Während der Trächtigkeit sind deutliche Immunsignale im Karunkel epithel sowie in den maternalen und fetalen Kapillaren zu erkennen, vereinzelt ist auch das Zytoplasma der Trophoblastriesenzellen positiv. Im peripartalen Zeitraum erkennt man nukleäre Signale in den uninukleären Trophoblastzellen. KE = Karunkel epithel; KS = Karunkelstroma; K_{mat} = maternale Kapillare; FS = fetales Stroma; K_{fet} = fetale Kapillare; TRZ = Trophoblastriesenzelle; UTZ = uninukleäre Trophoblastzelle; Messbalken = 50 µm.

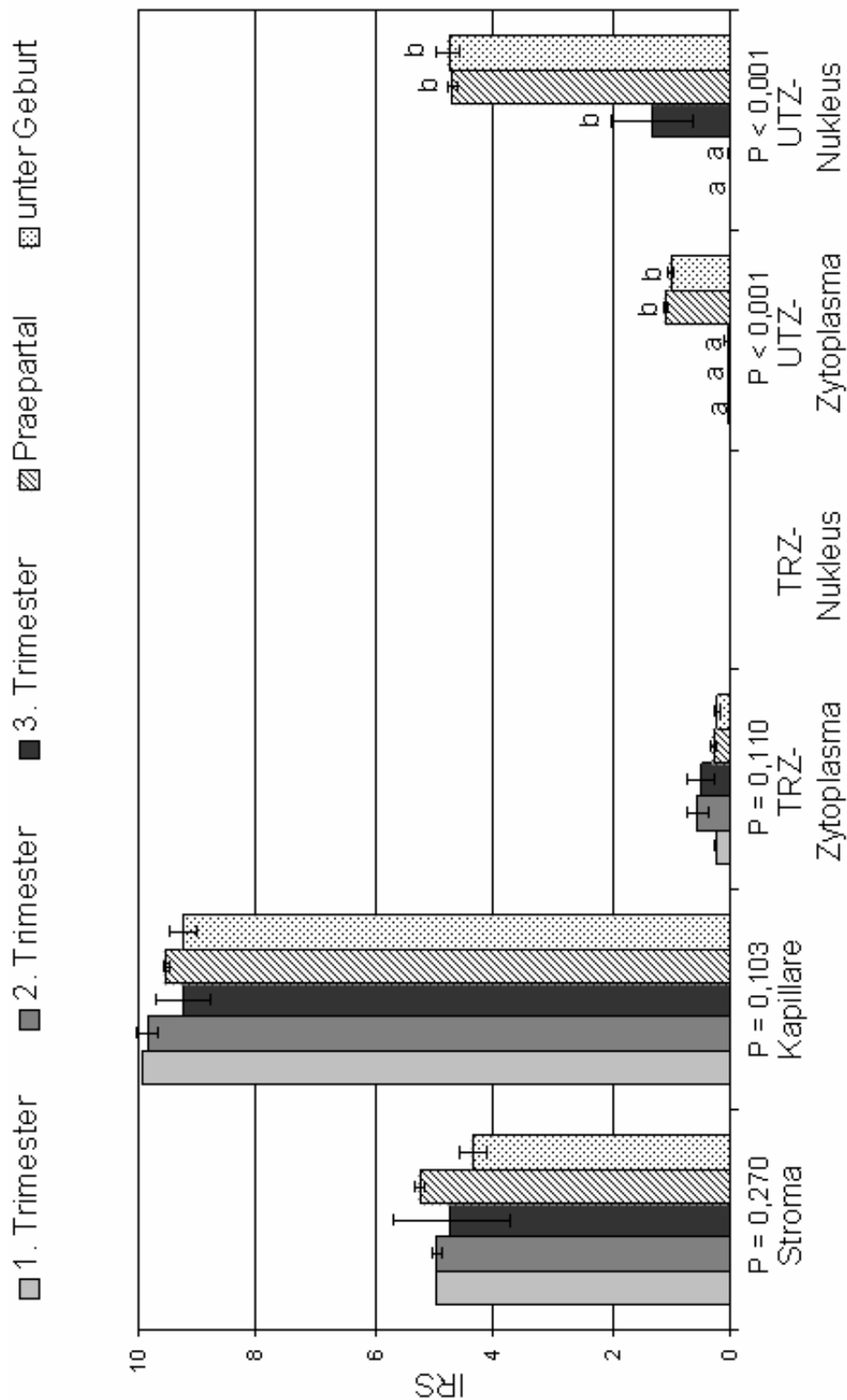


Abb. 4.23: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF2-R in den Kotyledonen mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. TRZ = Trophoblastriesenzellen; UTZ = uninukleäre Trophoblastzellen. Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. ($p < 0,05$; Tukey-Test).

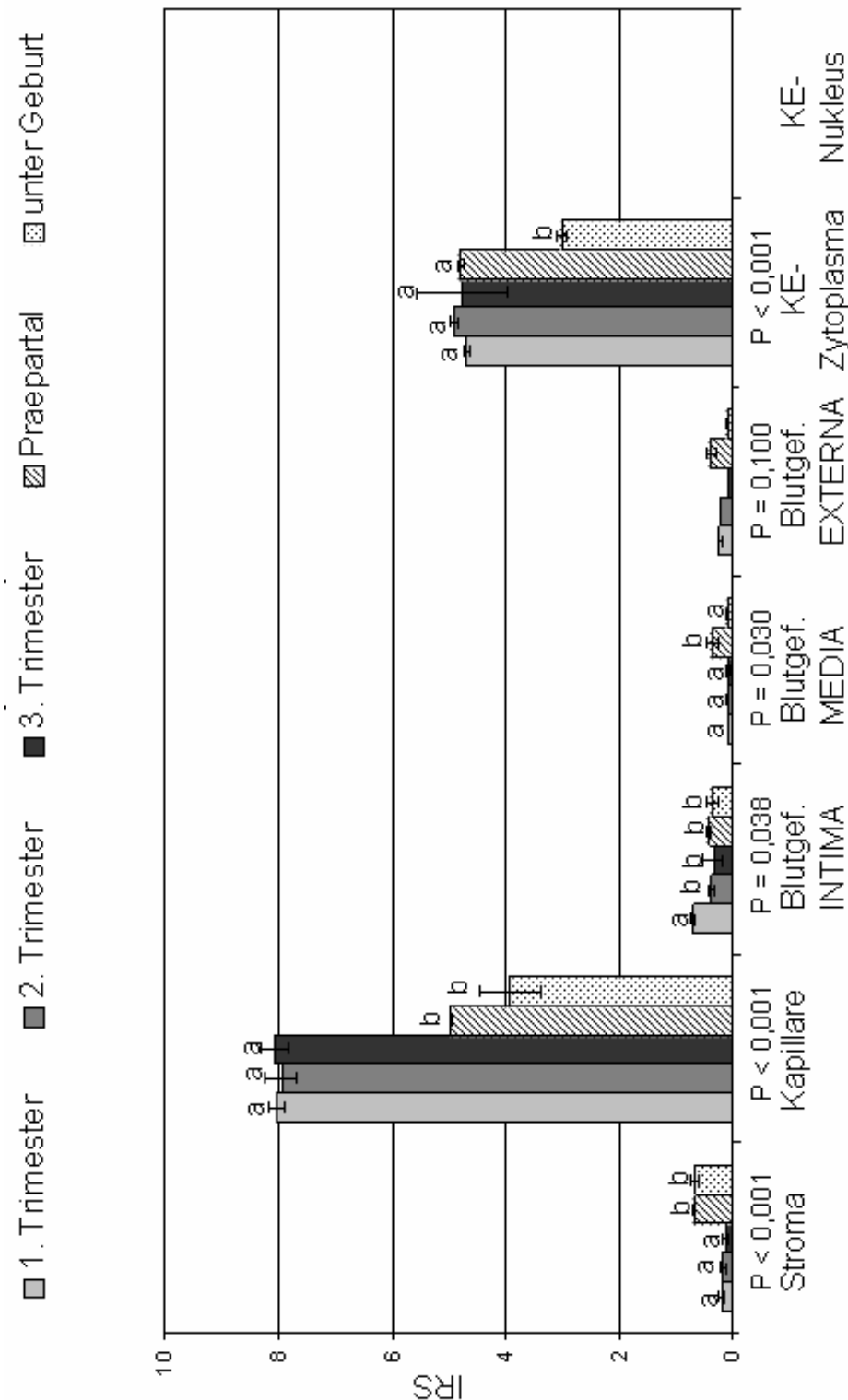


Abb. 4.24: Semiquantitative Erfassung der Immunfärbung für IGF2-R in den Karunkeln mittels eines immunreaktiven Scores (IRS). Unter den Säulen sind für die einzelnen beurteilten Zelltypen die p-Werte aus einfaktoriellen ANOVAs bezüglich eines Einflusses der Beobachtungsgruppe angegeben. KE = Karunkelepithel. Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. ($p < 0,05$; Tukey-Test).

4.1.5. IGFBP-Expression auf mRNA-Ebene

4.1.5.1. IGFBP-1

Die Expression von IGFBP-1-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in Rinderplazentomen aller untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 389 bp zu sehen (Abb. 4.25).

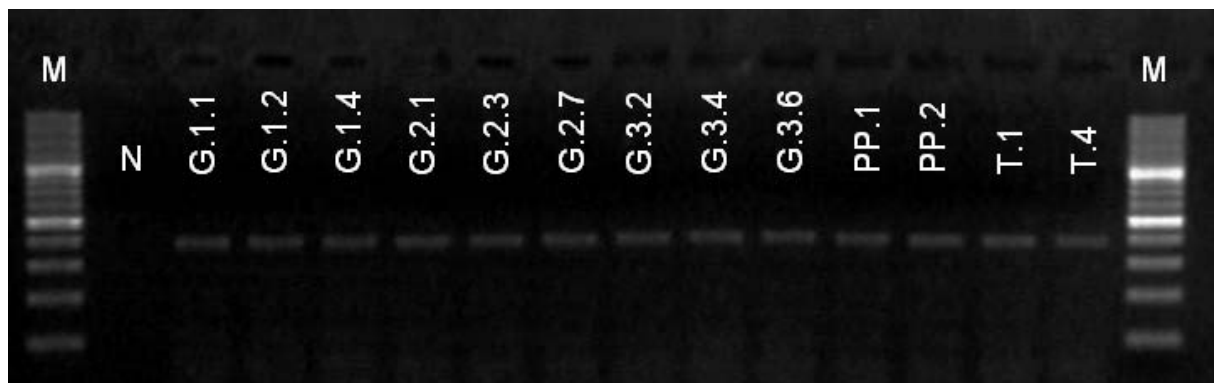


Abb. 4.25: Qualitativer Nachweis von IGFBP-1-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 389 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen Expression der IGFBP-1-mRNA in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR wies diese im Verlauf der Gravidität einen signifikanten Einfluss der Beobachtungsgruppe auf ($p = 0,015$). Im zweiten Trimester wurde ein mittlerer RGE von 2,8 als Minimum ermittelt. Danach stieg die mittlere relative Genexpression kontinuierlich auf 171,1 unter der Geburt. Die Stadien Präpartal und Geburt unterscheiden sich signifikant vom zweiten Trimester ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$; Abb. 4.26).

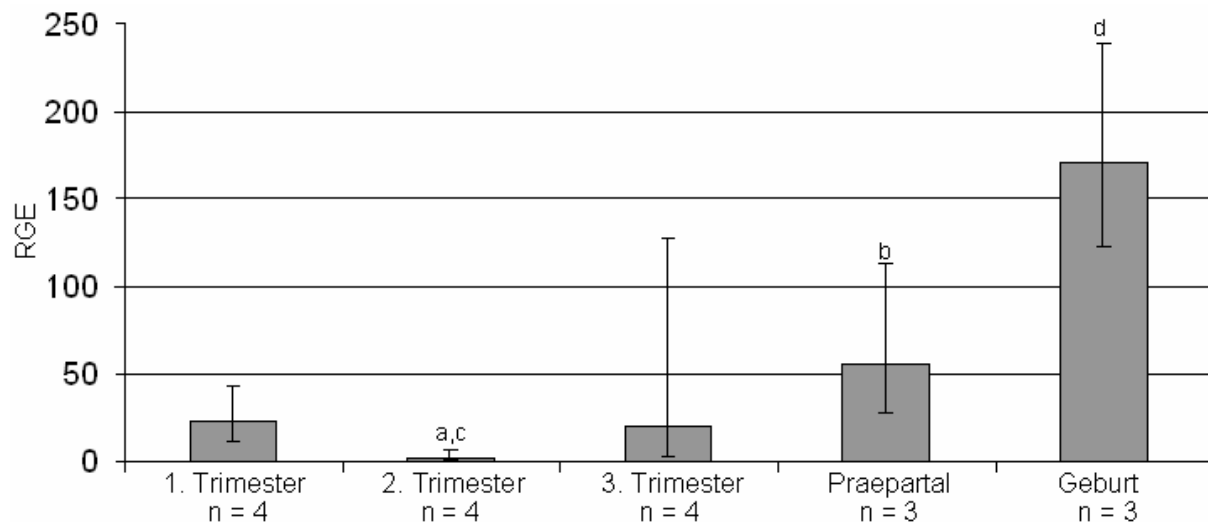


Abb. 4.26: Expression von IGFBP-1-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,015$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant ($a-b = p < 0,05$; $c-d = p < 0,01$; Tukey-Test).

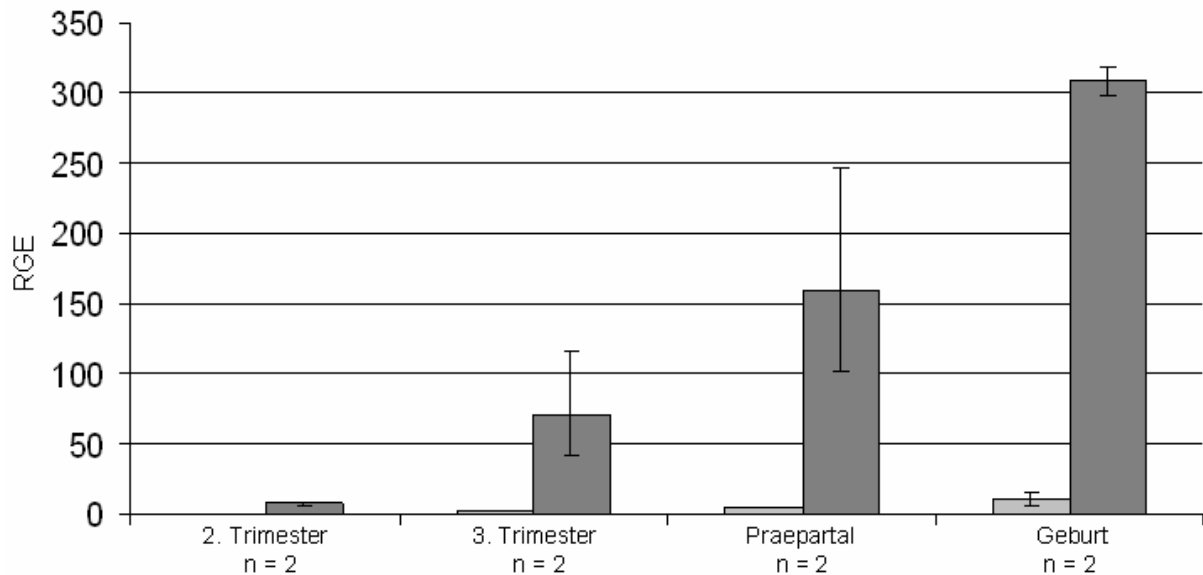


Abb. 4.27: Expression von IGFBP-1-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p < 0,001$) und der Beobachtungsgruppe ($p < 0,001$), während die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft nicht signifikant war ($p = 0,121$).

Bei der separaten Messung der IGFBP-1-mRNA Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p < 0,001$) sowie der Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel - ($p < 0,001$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren war nicht signifikant ($p = 0,121$). In der Kotyledone fand sich ein Expressionsanstieg auf niedrigem Niveau von 0,1 mittlerem RGE-Wert im zweiten Trimester bis auf 10,2 unter der Geburt. Sehr viel deutlicher war der kontinuierliche Expressionsanstieg in der Karunkel von 7,1 mittlerem RGE-Wert im zweiten Trimester auf 308,7 unter der Geburt (Abb. 4.27).

4.1.5.2. IGFBP-2

Die Expression der IGFBP-2-mRNA konnte in allen untersuchten Stadien in Rinderplazentomen mittels konventioneller RT-PCR qualitativ nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 278 bp zu sehen (Abb. 4.28).

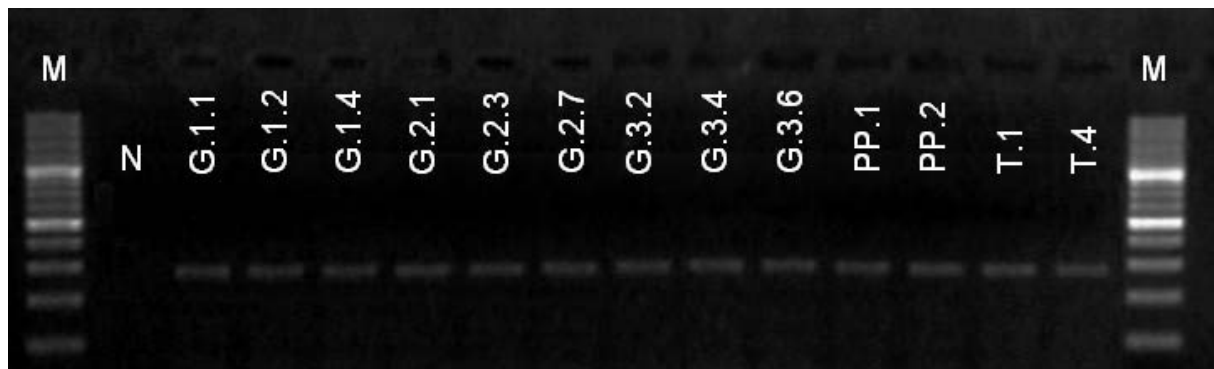


Abb. 4.28: Qualitativer Nachweis von IGFBP-2-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 278 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen IGFBP-2-mRNA-Expression in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR zwischen dem ersten Trimester und unter der Geburt wurde im Mittel mit 8,0 der höchste RGE-Wert zu Beginn der Gravidität ermittelt (Abb. 4.29). Im zweiten Trimester wurde mit einem mittleren RGE-Wert von 1,7 eine deutlich niedrigere IGFBP-2-Expression gemessen, die in der Folgezeit kontinuierlich auf 6,1 anstieg. In der einfaktoriellen ANOVA konnte für IGFBP-2 ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ermittelt werden ($p = 0,043$).

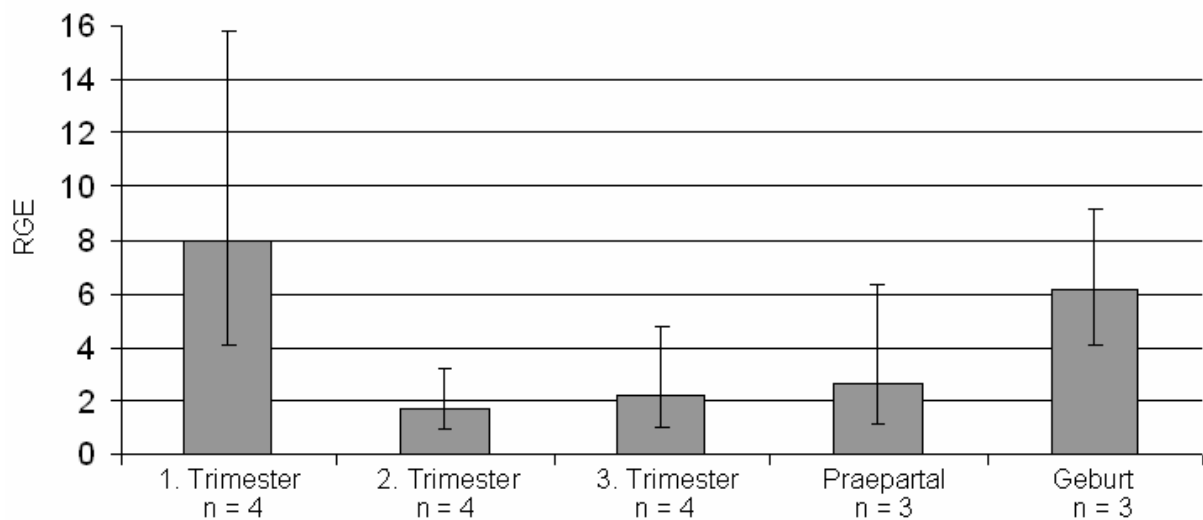


Abb. 4.29: Expression von IGFBP-2-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,043$).

Bei der separaten Messung der IGFBP-2-mRNA Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,047$) sowie der Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel - ($p < 0,001$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren war nicht signifikant ($p = 0,181$). Die IGFBP-2-Expression war nahezu ausschließlich in den Karunkeln lokalisiert, wo die mittleren RGE-Werte vom zweiten Trimester (3,7) kontinuierlich bis zur Geburt (29,8) anstiegen. In der Kotyledone wurden dagegen nur basale Expressionen gemessen (Abb. 4.30).

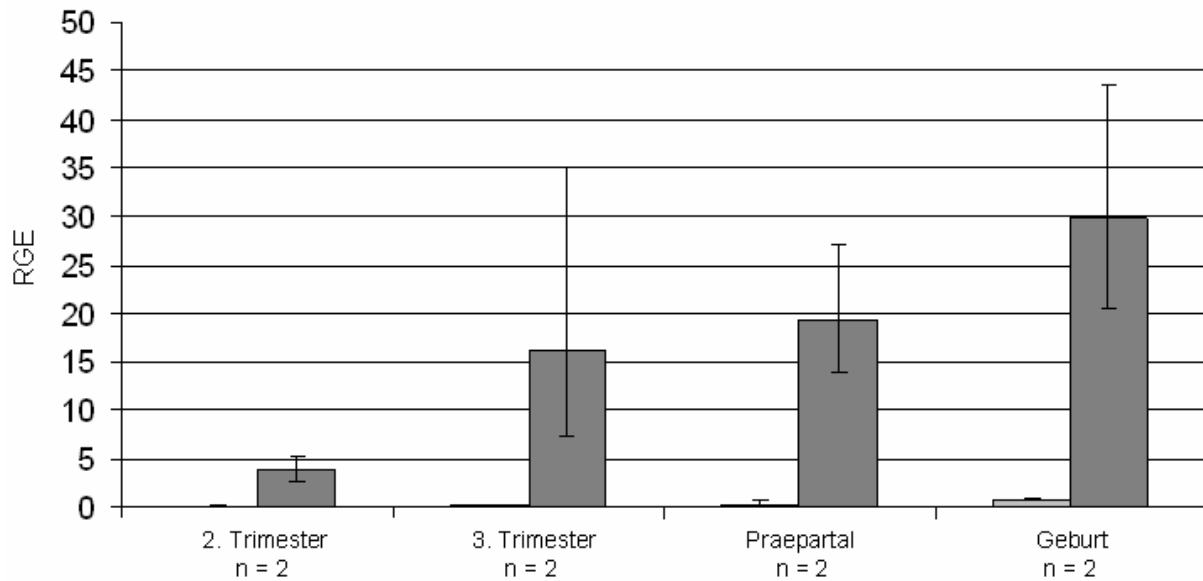


Abb. 4.30: Expression von IGFBP-2-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p < 0,001$) und der Beobachtungsgruppe ($p = 0,047$), während die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft nicht signifikant war ($p = 0,181$).

4.1.5.3. IGFBP-3

Die Expression von IGFBP-3-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in Rinderplazentomen aller untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war nur jeweils eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 229 bp zu sehen (Abb. 4.31).

Bei der Messung der relativen Expression der IGFBP-3-mRNA in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR wies diese im Verlauf der Gravidität keinen signifikanten Einfluss der Beobachtungsgruppe auf ($p = 0,426$). Die IGFBP-3 Expression schwankte zwischen mittleren RGE-Werten von 2,7 und 6,3 (Abb. 4.32).

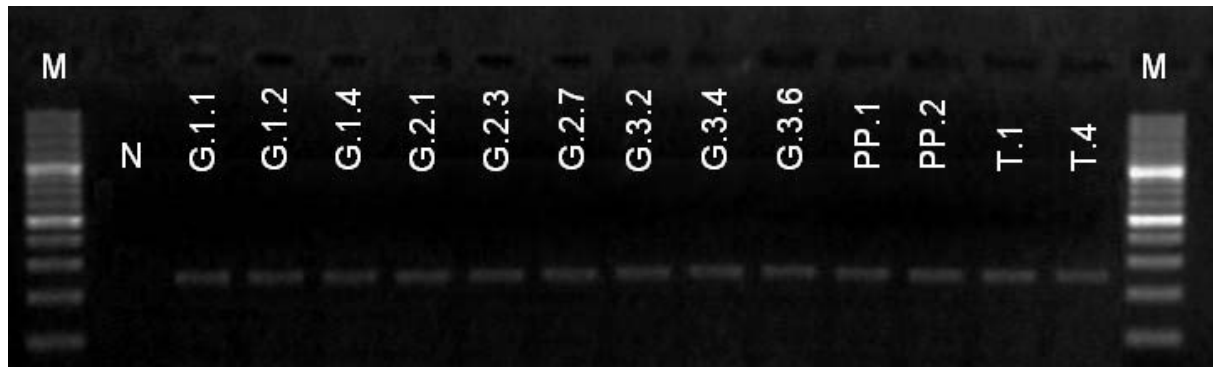


Abb. 4.31: Qualitativer Nachweis von IGFBP-3-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 229 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

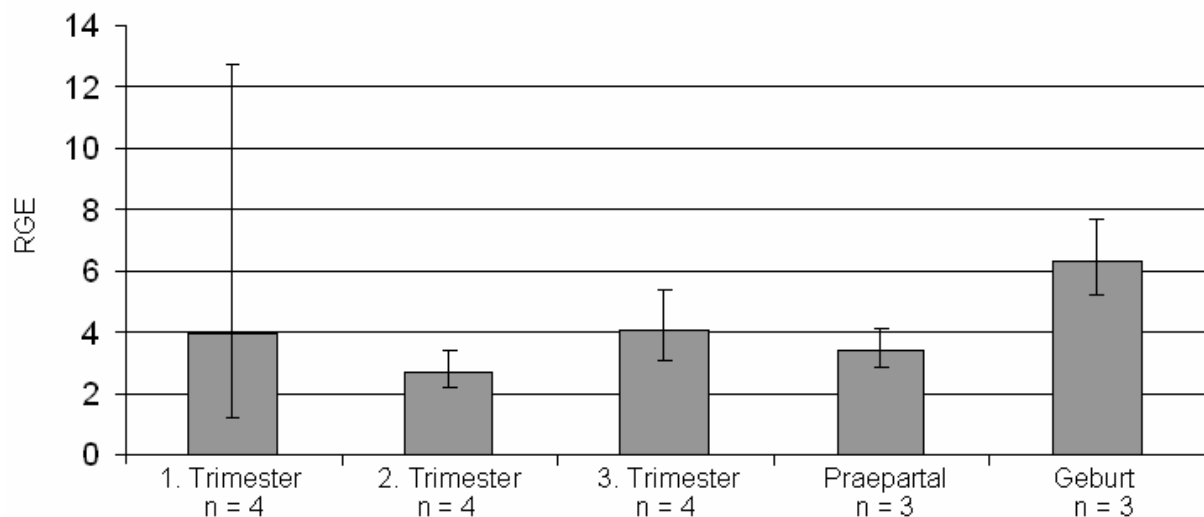


Abb. 4.32: Expression von IGFBP-3-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,426$).

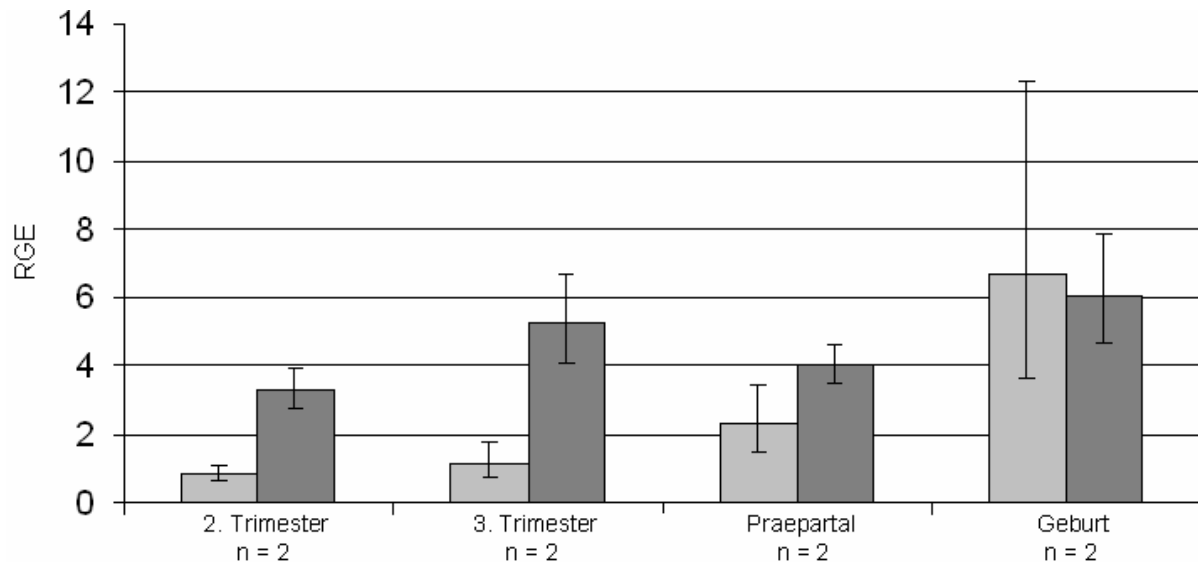


Abb. 4.33: Expression von IGFBP-3-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,002$) und der Beobachtungsgruppe ($p = 0,046$). Die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,025$) war ebenfalls signifikant.

Bei der separaten Messung der IGFBP-3-mRNA-Expression in Kotyledone und Karunkel zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,046$) sowie der Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel - ($p = 0,002$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren war ebenfalls signifikant ($p = 0,025$). In der Kotyledone fand sich ein Expressionsanstieg von 0,8 mittlerem RGE-Wert im zweiten Trimester auf ein Maximum von 6,7 unter der Geburt. Im maternalen Anteil des Plazentoms lag das Minimum ebenfalls im zweiten Trimester (3,3 mittlerer RGE-Wert) und das Maximum unter der Geburt (6,1), die IGFBP-3-Expression in der Karunkel zeigte jedoch keinen kontinuierlichen Anstieg (Abb. 4.33).

4.1.5.4. IGFBP-4

Die Expression der IGFBP-4-mRNA konnte in allen untersuchten Stadien in Rinderplazentomen mittels konventioneller RT-PCR qualitativ nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 427 bp zu sehen (Abb. 4.34).

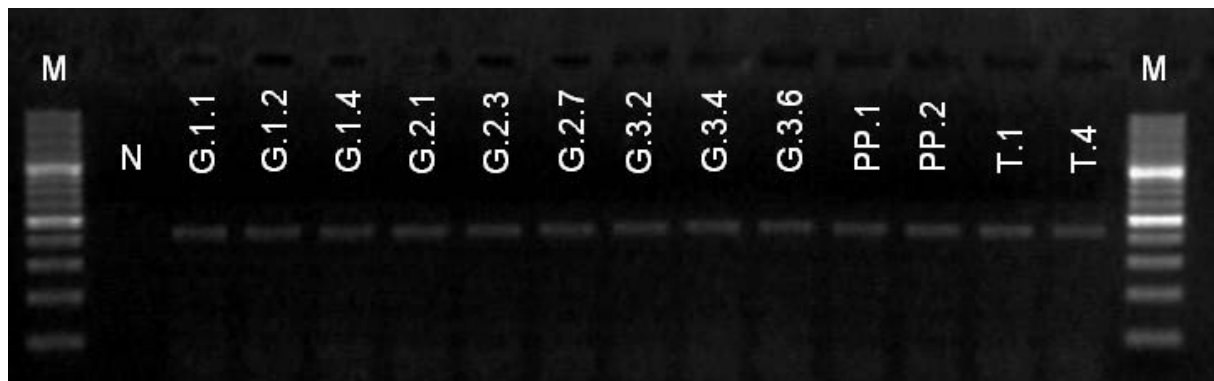


Abb. 4.34: Qualitativer Nachweis von IGFBP-4-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 427 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen IGFBP-4-mRNA-Expression in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR konnte im Verlauf der Gravidität kein signifikanter Zeiteffekt ermittelt werden ($p = 0,143$). Die Expression der IGFBP-4-mRNA schwankte zwischen mittleren RGE-Werten von 3,9 im ersten Trimester und 1,6 für das präpartale Stadium. Unter der Geburt wurde der Maximalwert von 6,5 RGE ermittelt (Abb. 4.35).

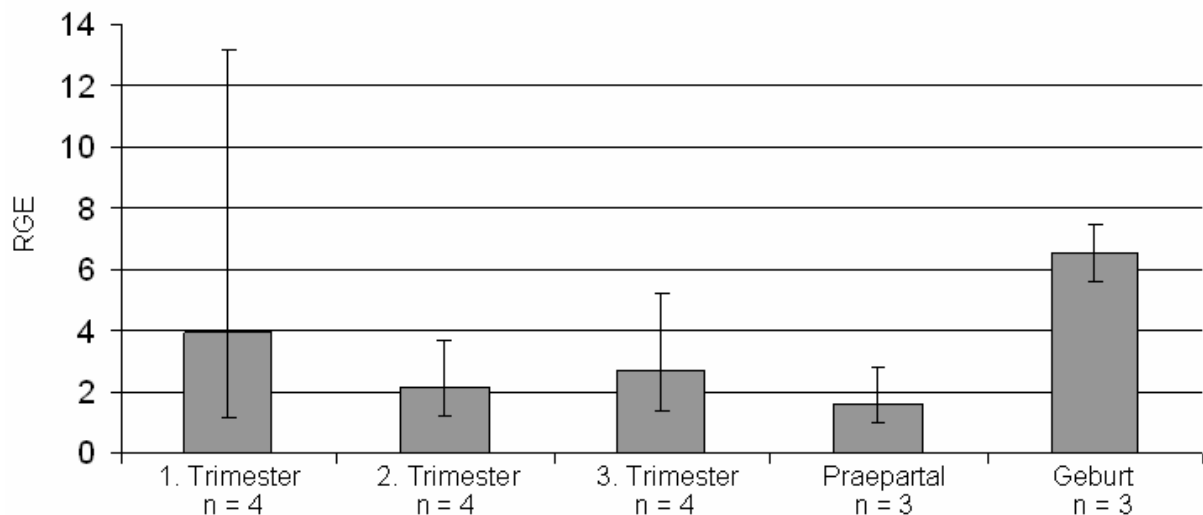


Abb. 4.35: Expression von IGFBP-4-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,143$).

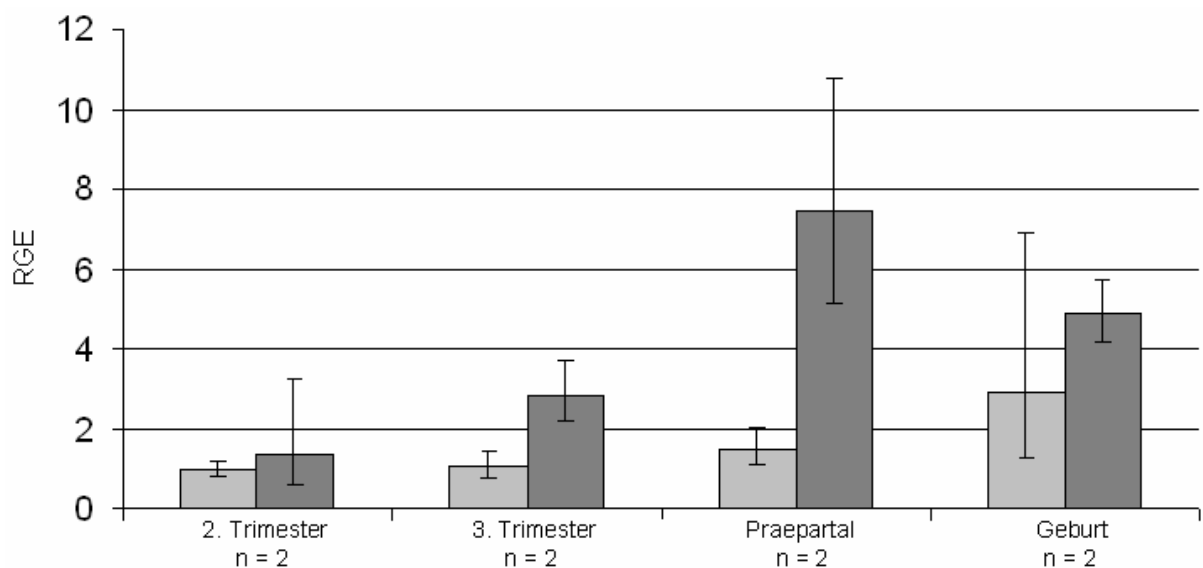


Abb. 4.36: Expression von IGFBP-4-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,028$), während der Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,068$) nicht signifikant, jedoch statistisch auffällig war. Die Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft war nicht signifikant ($p = 0,395$).

Bei der separaten Messung der IGFBP-4-mRNA-Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein statistisch auffälliger Effekt für die Beobachtungsgruppe ($p = 0,068$). Für die Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel – konnte ein signifikanter Einfluss ($p = 0,028$) ermittelt werden. Die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren war nicht signifikant ($p = 0,395$). In der Kotyledone zeigte die IGFBP-4-Expression einen Anstieg vom zweiten Trimester (1,0 mittlerer RGE-Wert) bis unter die Geburt (2,9 mittlerer RGE-Wert). Auch in der Karunkel zeigte sich ein Anstieg bis präpartal (7,5 mittlerer RGE-Wert), unter der Geburt wurde jedoch wieder eine niedrigere Expression gemessen (Abb. 4.36).

4.1.5.5. IGFBP-5

Die Expression von IGFBP-5-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in Rinderplazentomen aller untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 207 bp zu sehen (Abb. 4.37).

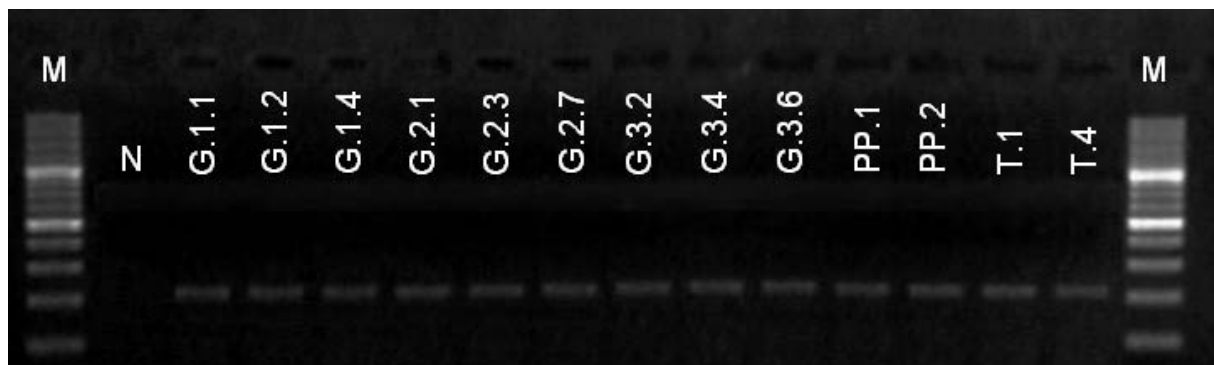


Abb. 4.37: Qualitativer Nachweis von IGFBP-5-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 207 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Gravitationsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

Bei der Messung der relativen Expression der IGFBP-5-mRNA in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR wies diese im Verlauf der Gravidität keinen signifikanten Einfluss der Beobachtungsgruppe auf ($p = 0,624$). Im zweiten Trimester wurde ein mittlerer RGE-Wert von 1,9 als Minimum ermittelt, das Maximum lag mit 3,6 in der Gruppe „Geburt“ vor (Abb. 4.38).

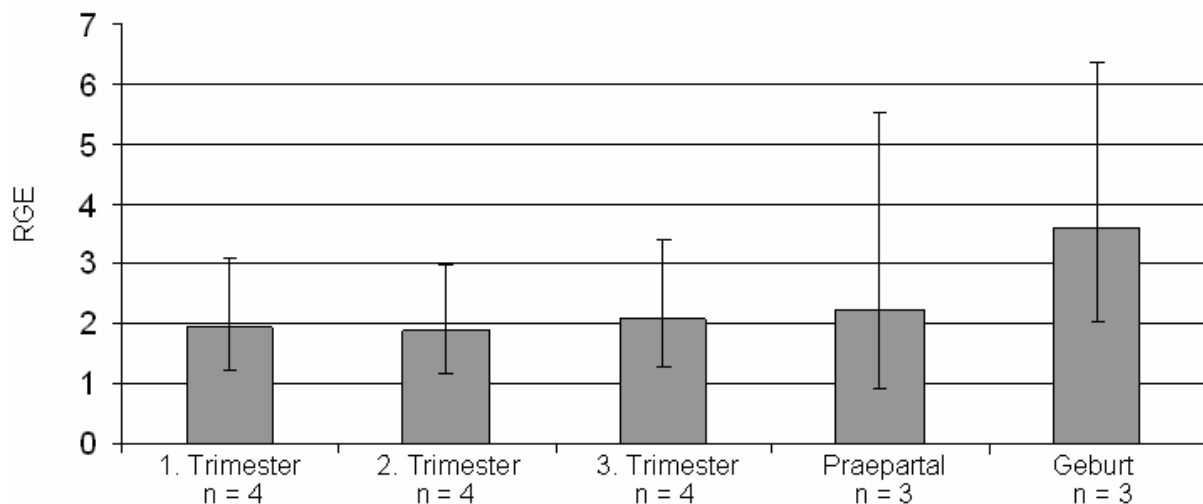


Abb. 4.38: Expression von IGFBP-5-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,624$).

Bei der separaten Messung der IGFBP-5-mRNA-Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,017$), für die Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel - ($p = 0,006$) und für die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren ($p = 0,009$). In der Kotyledone fand man einen Expressionsanstieg von 14,1 mittlerem RGE-Wert im zweiten Trimester bis auf 213,0 unter der Geburt. Die IGFBP-5-Expression in der Karunkel war hingegen annähernd konstant (Abb. 4.39).

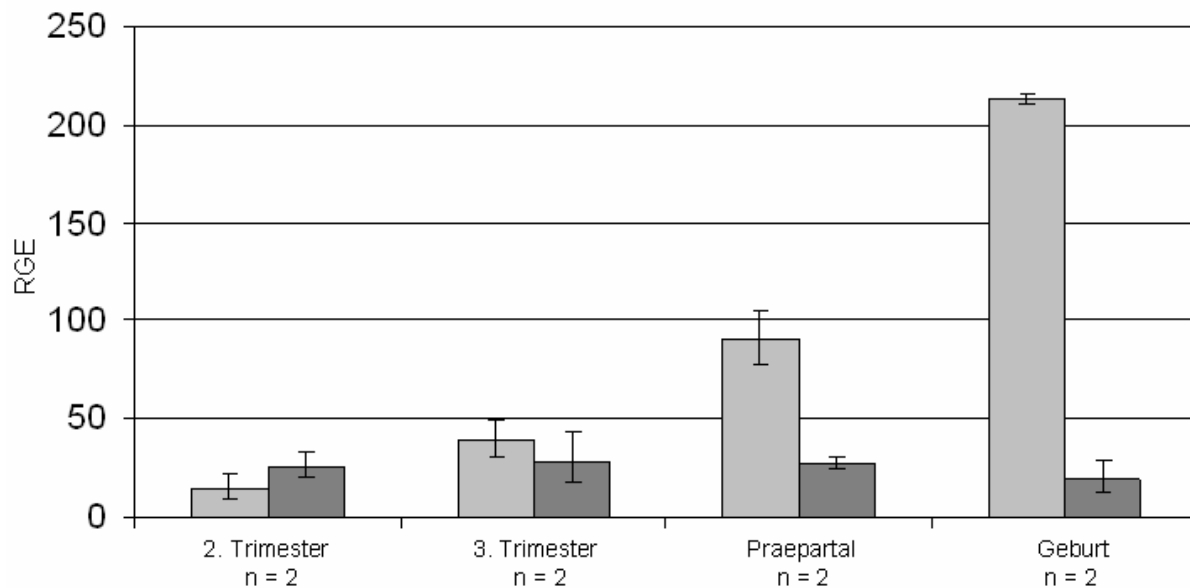


Abb. 4.39: Expression von IGFBP-5-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,006$), der Beobachtungsgruppe ($p = 0,017$), und der Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,009$).

4.1.5.6. IGFBP-6

Die Expression der IGFBP-6-mRNA konnte in allen untersuchten Stadien in Rinderplazentomen mittels konventioneller RT-PCR qualitativ nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 229 bp zu sehen (Abb. 4.40).

Bei der Messung der relativen IGFBP-6-mRNA-Expression in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR konnte im Verlauf der Gravidität ein signifikanter Effekt der Beobachtungsgruppe ermittelt werden ($p < 0,001$). Die Expression der IGFBP-6-mRNA weist ein Maximum im ersten Trimester mit einem mittleren RGE-Wert von 21,5 auf. Dieser unterscheidet sich signifikant ($p < 0,001$) von allen anderen Beobachtungsgruppen, die zwischen mittleren RGE-Werten von 1,6 und 2,5 schwankten (Abb. 4.41).

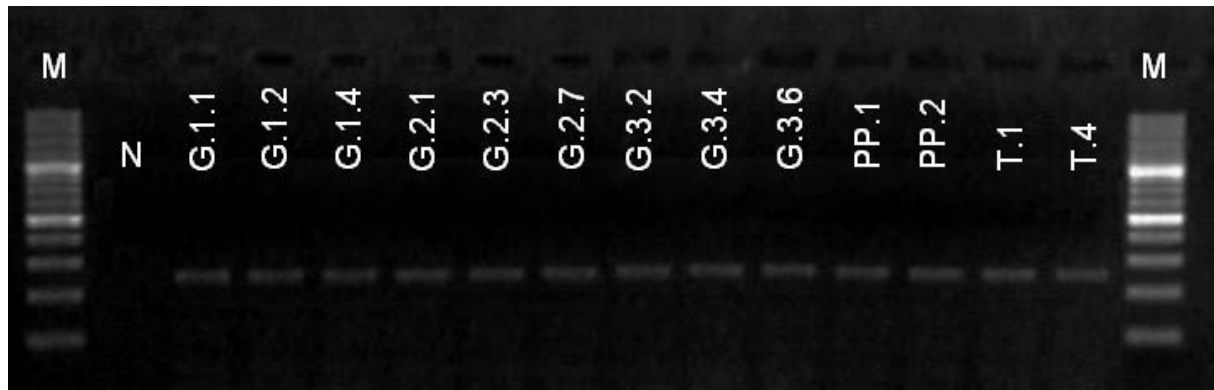


Abb. 4.40: Qualitativer Nachweis von IGFBP-6-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 229 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

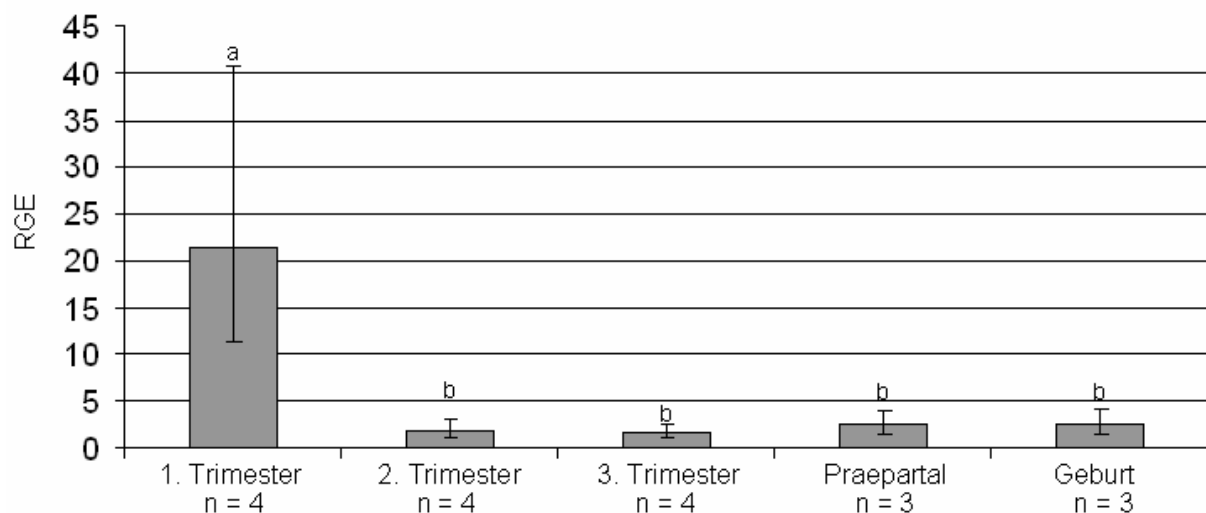


Abb. 4.41: Expression von IGFBP-6-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p < 0,001$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant. ($a-b = < 0,001$; Tukey-Test).

Bei der separaten Messung der IGFBP-6-mRNA-Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Effekt der Beobachtungsgruppe ($p < 0,01$) und der Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel – ($p = 0,007$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren war signifikant ($p = 0,002$). In der Kotyledone zeigte die IGFBP-6-Expression einen Anstieg vom zweiten Trimester (1,2 mittlerer RGE-Wert) bis zur präpartalen Gruppe (42,6 mittlerer RGE-Wert), zwischen präpartal und unter der Geburt war kein Unterschied zu erkennen. IGFBP-6 zeigte in der Karunkel vom ersten Trimester bis zur präpartalen Gruppe eine annähernd gleiche Expression (16,3 bis 21,4 mittlere RGE-Werte) und stieg dann unter der Geburt deutlich auf einen mittleren RGE-Wert von 54,7 an (Abb. 4.42).

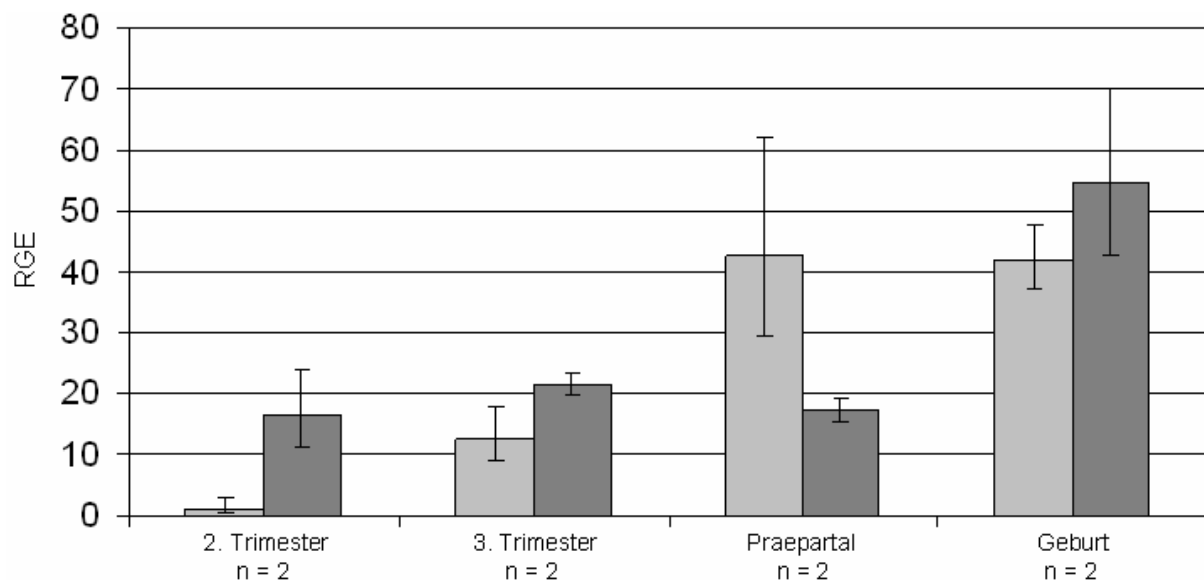


Abb. 4.42: Expression von IGFBP-6-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p = 0,007$), der Beobachtungsgruppe ($p < 0,01$) und der Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,002$).

4.1.5.7. IGFBP-7

Die Expression von IGFBP-7-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in Rinderplazentomen aller untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 220 bp zu sehen (Abb. 4.43).

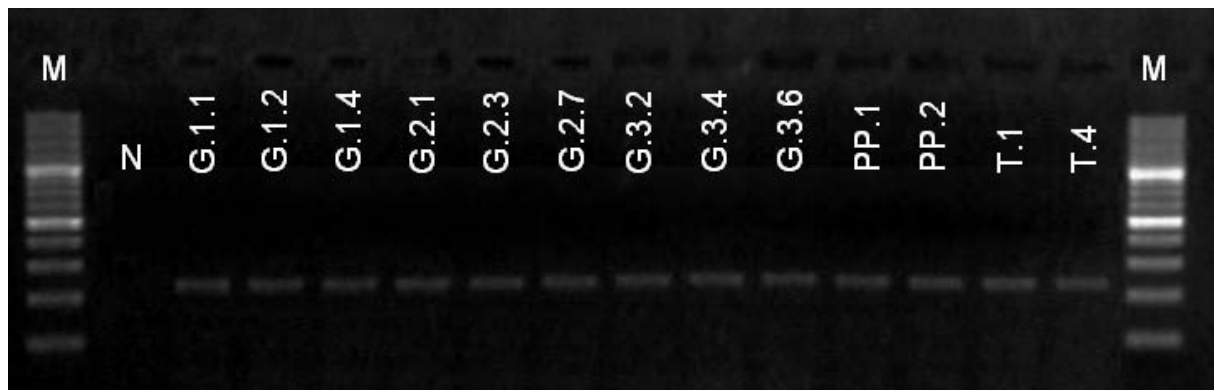


Abb. 4.43: Qualitativer Nachweis von IGFBP-7-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 220 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; G1.1 – G3.6 = Proben aus dem Graviditätsverlauf; PP.1, PP.2 = präpartale Proben; T.1, T.4 = Proben unter der Geburt.

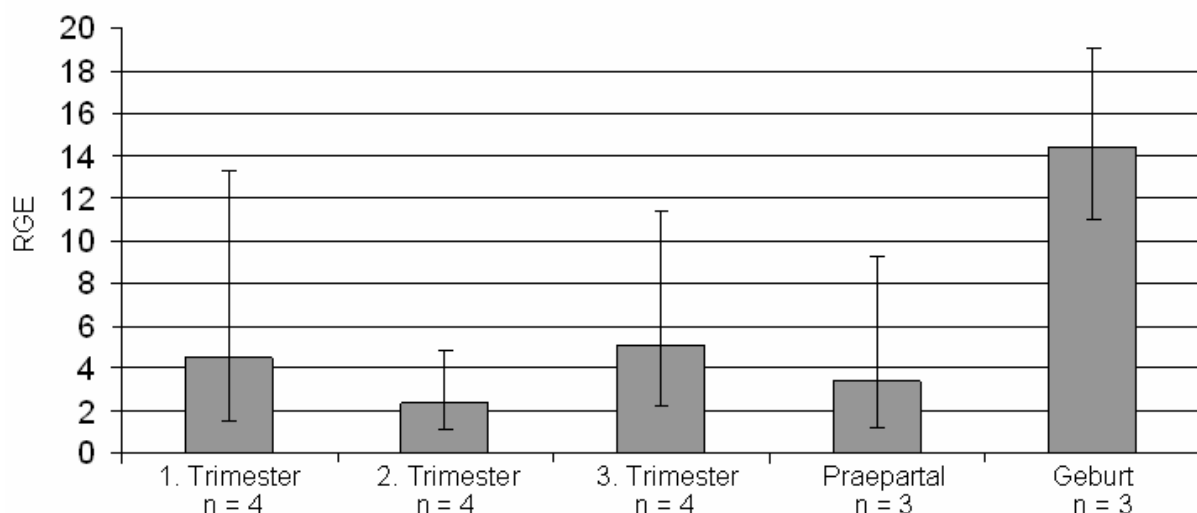


Abb. 4.44: Expression von IGFBP-7-mRNA in Gesamtplazentomen. Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,122$).

Bei der Messung der relativen Expression der IGFBP-7-mRNA in Gesamtplazentomen mittels Real-Time RT-PCR wies diese im Verlauf der Gravidität keinen signifikanten Einfluss der Beobachtungsgruppe auf ($p = 0,122$). Die Expression von IGFBP-7 zeigte ein Maximum (14,4 mittlerer RGE-Wert) unter der Geburt (Abb. 4.44).

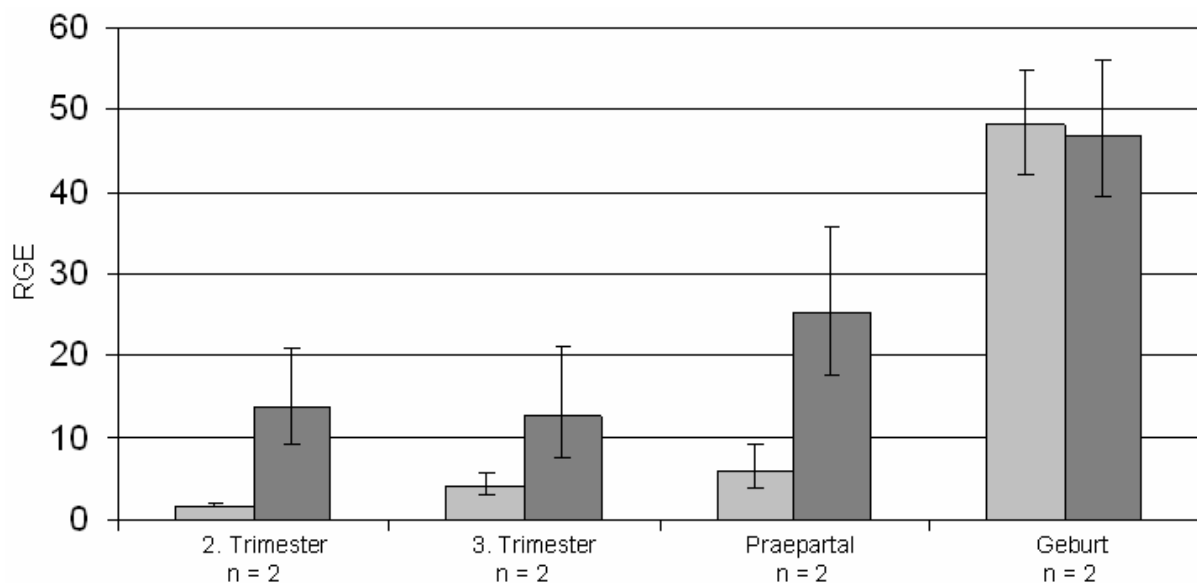


Abb. 4.45: Expression von IGFBP-7-mRNA in Kotyledonen (hellgrau) und Karunkeln (dunkelgrau). Dargestellt ist die mittels Real-Time (TaqMan) RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der zweifaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Gewebeherkunft ($p < 0,001$), der Beobachtungsgruppe ($p = 0,008$), und der Wechselwirkung zwischen Beobachtungsgruppe und Gewebeherkunft ($p = 0,003$).

Bei der separaten Messung der IGFBP-7-mRNA-Expression in Kotyledonen und Karunkeln zwischen dem zweiten Trimester und unter der Geburt ergab sich ein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe ($p = 0,008$), der Herkunft des Probenmaterials - Kotyledone bzw. Karunkel - ($p < 0,001$) sowie eine signifikante Wechselwirkung zwischen beiden Einflussfaktoren ($p = 0,003$). In der Kotyledone zeigte sich eine schwach ansteigende Expression zwischen dem zweiten Trimester (1,7 mittlerer RGE-Wert) und der präpartalen Gruppe (5,9 mittlerer RGE-Wert), unter der Geburt kommt es zu einem weiteren Expressionsanstieg auf ein Maximum von 48,1 mittlerer RGE-Wert. In den Karunkeln fand sich nach weitgehend konstanter Expression im zweiten und dritten Trimester (mittlere RGE-Werte 13,7 und 12,5) präpartal ein Anstieg auf 25,1, der sich auf 46,9 unter der Geburt fortsetzte. Während zwischen dem zweiten Trimester und der präpartalen Phase die IGFBP-7-Expression in den Karunkeln deutlich höher war als in den Kotyledonen, war unter der Geburt kein erheblicher Unterschied zwischen dem fetalen bzw. maternalen Anteil der Plazentome zu erkennen (Abb. 4.45).

4.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer nach Superovulation (MOET) und aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktions-Protokollen (IVP1 und IVP2)

4.2.1. Beschreibung der MOET- und IVP-Feten

Die hier präsentierten Daten wurden von Prof. Dr. S. Hiendleder, vormals Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilian-Universität München für eigene statistische Berechnungen im Hinblick auf Zusammenhänge zwischen der plazentaren Expression des IGF-Systems und dem fetalen Wachstum zur Verfügung gestellt.

4.2.1.1. Scheitel-Steiß-Länge

Für die fetale Scheitel-Steiß-Länge (SSL) ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p < 0,001$; siehe Abb. 4.46). Sie war mit $14,2 \pm 0,8$ cm (IVP-1) bzw. $14,2 \pm 0,9$ cm (IVP-2) in beiden IVP Gruppen deutlich höher als in der MOET-Gruppe ($10,9 \pm 0,2$ cm). Die SSL von Feten aus Einlingsgraviditäten war signifikant länger als bei Feten aus Zwillingsgraviditäten ($p = 0,038$). In der MOET-Gruppe betrug die SSL bei den Einlingen $11,0 \pm 0,1$ cm und bei den Zwillingen $10,9 \pm 0,2$ cm. Aufgetrennt in die beiden IVP-Gruppen lag die SSL bei IVP-1 bei $14,8 \pm 0,2$ cm bzw. $14,0 \pm 0,9$ cm und bei IVP-2 $14,9 \pm 0,6$ cm und $13,4 \pm 0,8$ cm. Die Wechselwirkung zwischen den Faktoren Versuchsgruppe und Fetenzahl (Einlingen oder Zwilling) war nicht signifikant ($p = 0,225$).

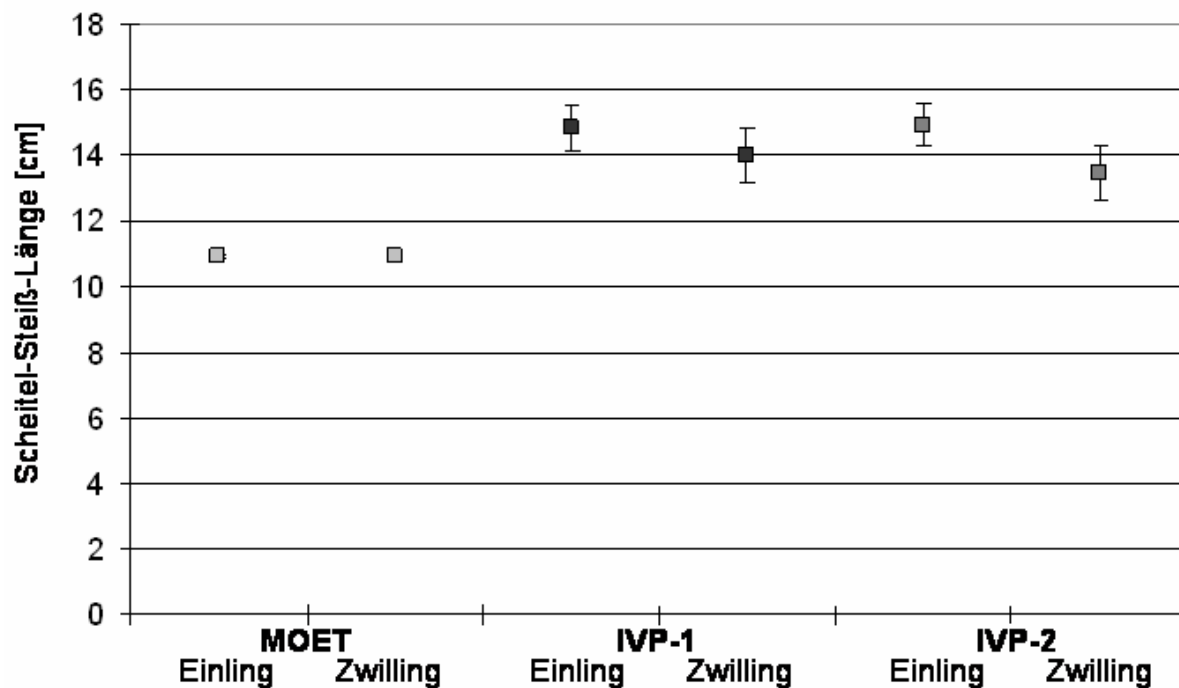


Abb. 4.46: Scheitel-Steiß-Längen ($\bar{x} \pm SD$) in cm von Rinderfeten am 80. Tag der Gravidität aus konventionellem Embryotransfer (MOET: 8 Feten aus 5 Graviditäten) sowie aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktions-Protokollen (IVP-1: 8 Feten aus 5 Graviditäten; IVP-2: 8 Feten aus 6 Graviditäten). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p < 0,001$). Die Scheitel-Steiß-Längen von Feten aus Einlings- bzw. Zwillingsgravidität waren ebenfalls signifikant verschieden ($p = 0,038$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,225$).

4.2.1.2. Brustumfang

Für den fetalen Brustumfang ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,005$; Abb.4.47). Er war mit $9,8 \pm 0,7$ cm (IVP-1) bzw. $9,8 \pm 0,6$ cm (IVP-2) in beiden IVP-Gruppen deutlich höher als in der MOET-Gruppe ($8,7 \pm 0,4$ cm). Der Unterschied zwischen Einlingen und Zwillingen (MOET-Gruppe $8,8 \pm 0,7$ cm bzw. $8,7 \pm 0,3$ cm; IVP-1: $10,4 \pm 0,3$ cm bzw. $9,6 \pm 0,6$ cm; IVP-2: $10,3 \pm 0,2$ cm bzw. $9,3 \pm 0,8$ cm) war ebenfalls signifikant ($p = 0,031$). Beim Brustumfang lag keine signifikante Wechselwirkung zwischen den Gruppen und der Fetenzahl (Einling oder Zwilling) vor ($p = 0,329$).

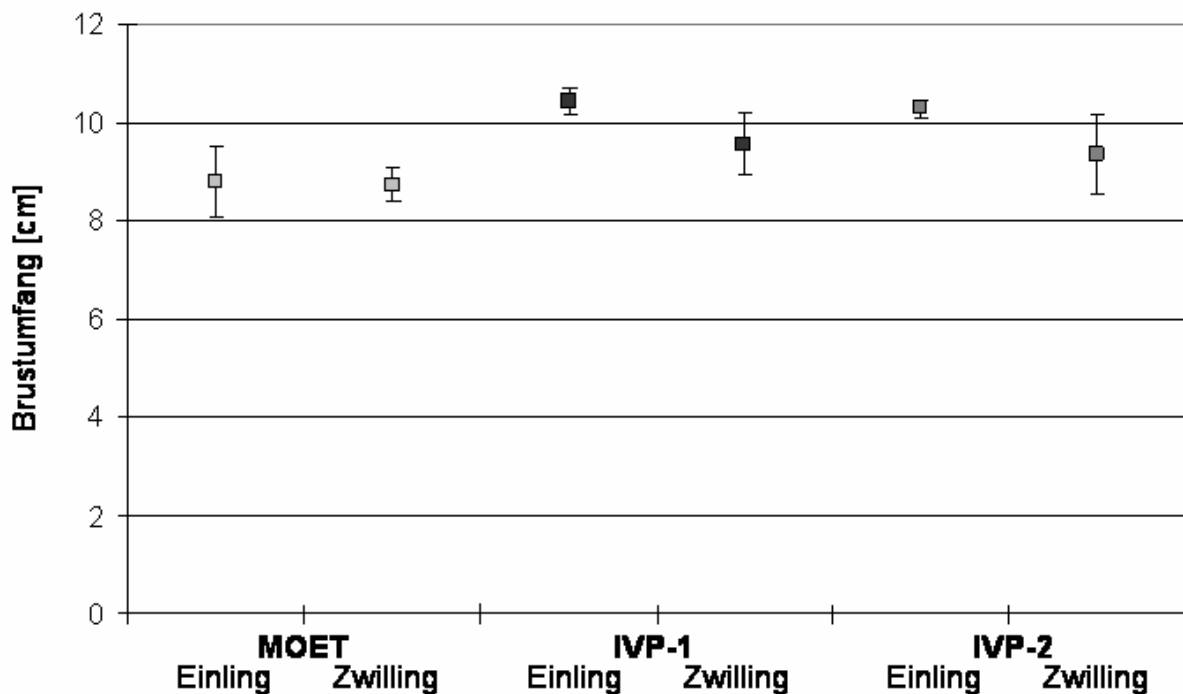


Abb. 4.47: Brustumfang ($\bar{x} \pm SD$) in cm von Rinderfeten am 80. Tag der Gravidität aus konventionellem Embryotransfer (MOET: 8 Feten aus 5 Graviditäten) sowie aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktions-Protokollen (IVP-1: 8 Feten aus 5 Graviditäten; IVP-2: 8 Feten aus 6 Graviditäten). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,005$). Die Brustumfänge von Feten aus Einlings- bzw. Zwillingssgravidität waren ebenfalls signifikant verschieden ($p = 0,031$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,329$).

4.2.1.3. Gewicht

Auch für das fetale Gewicht ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,002$). Das Fetengewicht war mit $95,3 \pm 14,1$ g bzw. $95,6 \pm 17,1$ g in der IVP-1- bzw. IVP-2-Gruppe deutlich höher als in der MOET-Gruppe ($65,9 \pm 6,4$ g). Feten aus Einlingsgraviditäten waren signifikant schwerer als aus Zwillingsgraviditäten ($p = 0,011$; Abb. 4.48). In der MOET-Gruppe wies das Gewicht bei den Einlingen $70,0 \pm 11,7$ g und bei den Zwillingen $63,8 \pm 2,0$ g auf. In den IVP-Gruppen hatten die Einlinge ein Gewicht von $112,2 \pm 12,2$ g (IVP-1) sowie $107,9 \pm 11,2$ g (IVP-2), während die Zwillinge $89,6 \pm 10,1$ g bzw. $83,3 \pm 18,3$ g wogen. Die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren war nicht signifikant ($p = 0,391$).

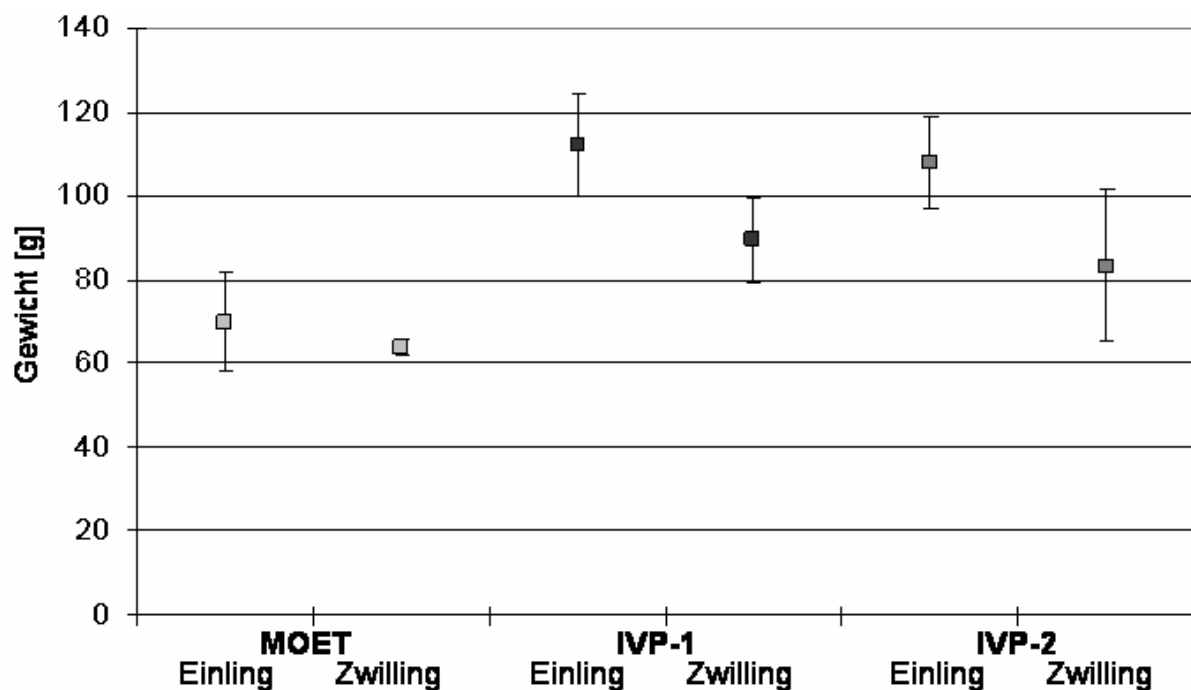


Abb. 4.48: Gewicht ($\bar{x} \pm SD$) in g von Rinderfeten am 80. Tag der Gravidität aus konventionellem Embryotransfer (MOET: 8 Feten aus 5 Graviditäten) sowie aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktions-Protokollen (IVP-1: 8 Feten aus 5 Graviditäten; IVP-2: 8 Feten aus 6 Graviditäten). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,002$). Die Gewichte von Feten aus Einlings- bzw. Zwillingsgravidität waren ebenfalls signifikant verschieden ($p = 0,011$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,391$).

4.2.1.4. Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Länge

Für das Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Länge ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p < 0,001$; Abb.4.49). Dieses Verhältnis war mit $0,69 \pm 0,01$ (IVP-1) bzw. $0,69 \pm 0,02$ (IVP-2) in beiden IVP-Gruppen niedriger als in der MOET-Gruppe ($0,80 \pm 0,03$). Der Unterschied zwischen Einlingen und Zwillingen (MOET-Gruppe: $0,80 \pm 0,06$ bzw. $0,80 \pm 0,02$; IVP-1: $0,70 \pm 0,01$ bzw. $0,68 \pm 0,00$; IVP-2: $0,69 \pm 0,02$ bzw. $0,69 \pm 0,02$) war nicht signifikant ($p = 0,611$). Bei dem Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Länge lag keine signifikante Wechselwirkung zwischen den Gruppen und der Fetenzahl (Einling oder Zwilling) vor ($p = 0,731$).

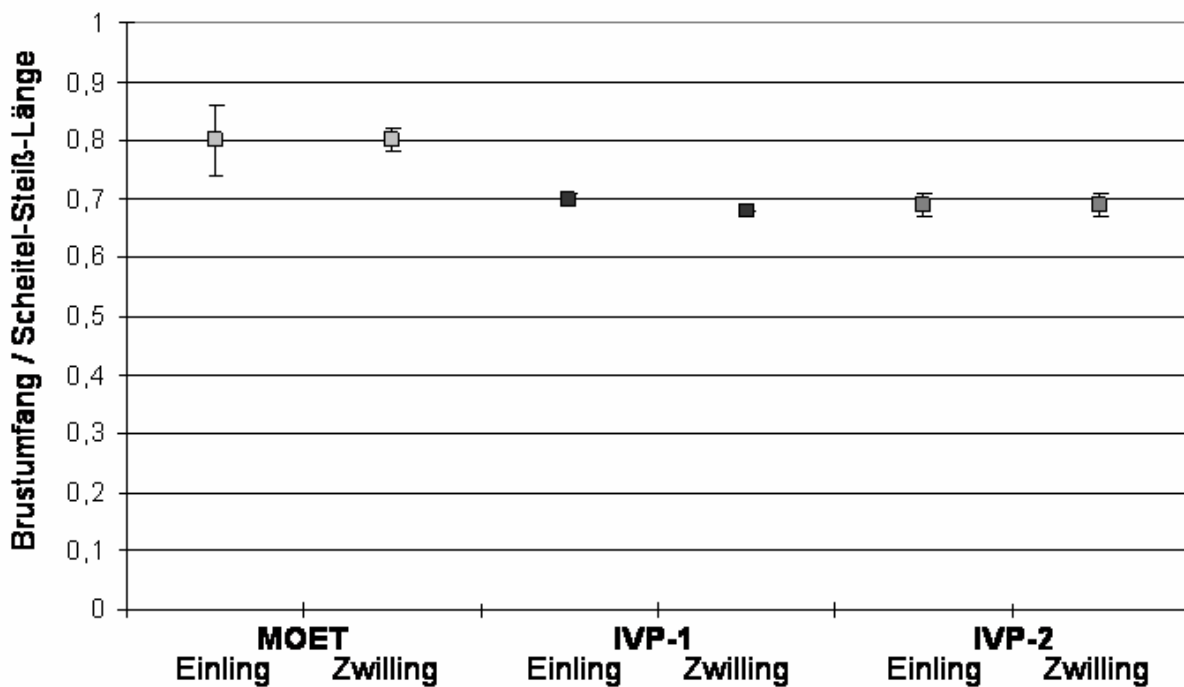


Abb. 4.49: Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Länge ($\bar{x} \pm SD$) von Rinderfeten am 80. Tag der Gravidität aus konventionellem Embryotransfer (MOET: 8 Feten aus 5 Graviditäten) sowie aus zwei unterschiedlichen In vitro-Produktions-Protokollen (IVP-1: 8 Feten aus 5 Graviditäten; IVP-2: 8 Feten aus 6 Graviditäten). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p < 0,001$). Das Verhältnis Brustumfang zu Scheitel-Steiß-Längen von Feten aus Einlings- bzw. Zwillingssgravidität waren nicht signifikant verschieden ($p = 0,611$). Die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,731$).

4.2.2. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus MOET sowie aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP1, IVP2)

4.2.2.1. IGF1

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGF1-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 353 bp zu sehen (Abb. 4.50).



Abb. 4.50: Qualitativer Nachweis von IGF1-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 353 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Die Messung der relativen IGF1-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 3,5. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 4,0 bzw. 4,1. Der Einfluss der Versuchsgruppe erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als nicht signifikant ($p = 0,687$; Abb. 4.51).

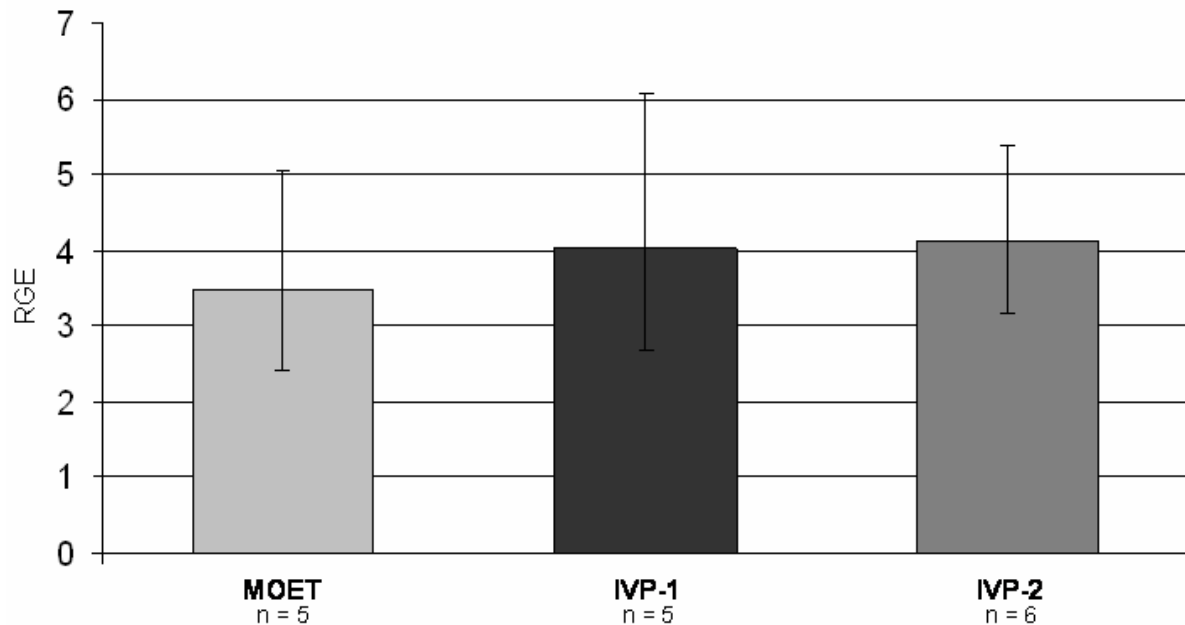


Abb. 4.51: Expression von IGF1-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,687$).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGF1-mRNA Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie dem Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.52).

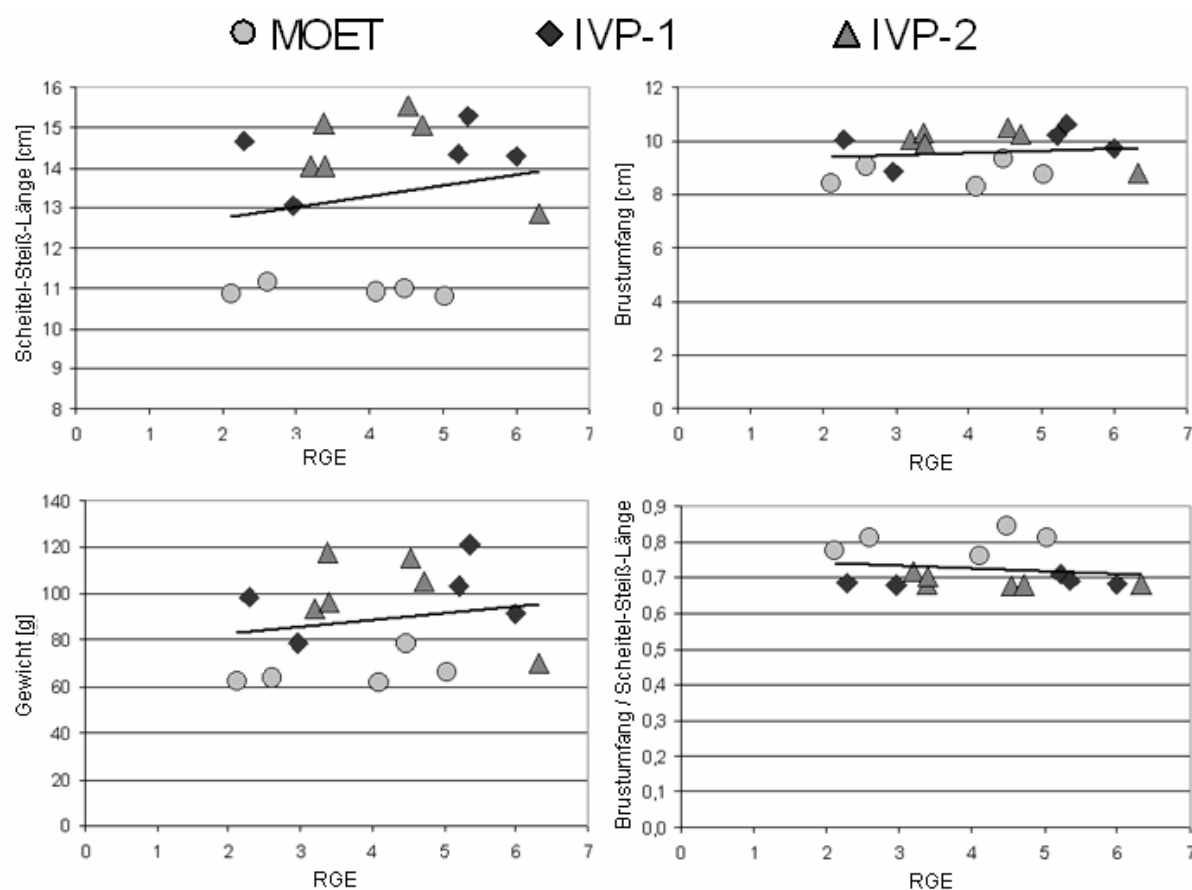


Abb. 4.52: Darstellung der relativen IGF1-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,473$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,572$; RGE zu Gewicht: $p = 0,512$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,487$).

4.2.2.2. IGF2

Die Expression von IGF2-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 161 bp zu sehen (Abb. 4.53).

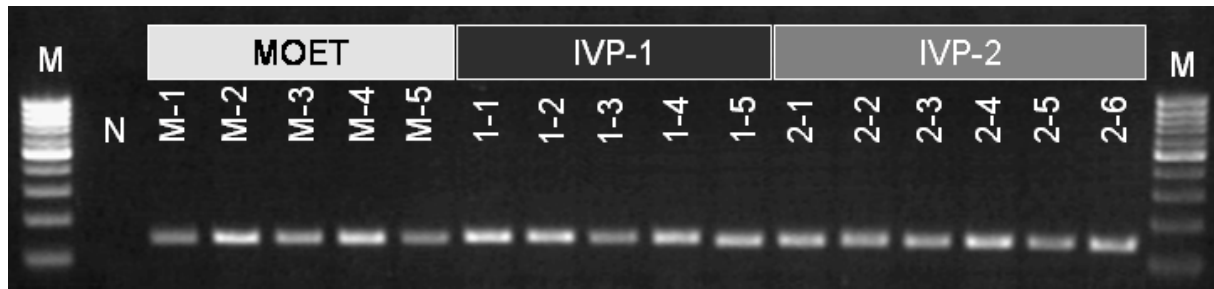


Abb. 4.53: Qualitativer Nachweis von IGF2-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 161 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

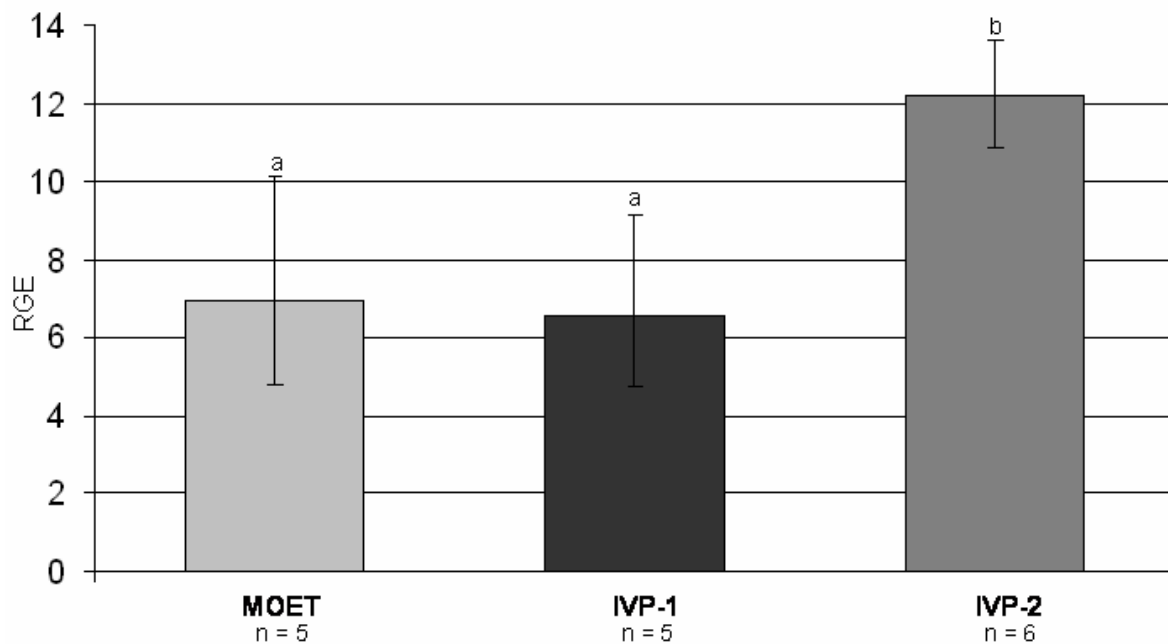


Abb. 4.54: Expression von IGF2-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,001$). Säulen mit unterschiedlicher Markierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$; Tukey-Test).

Die Messung der relativen IGF2-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der IVP-2 Gruppe einen mittleren RGE Wert von 12,2, während in der IVP-1- und MOET-Gruppe mittlere RGE-Werte von 6,6 bzw. 7,0 gemessen wurden (Abb. 4.54). In der einfaktoriellen ANOVA zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,001$). Ein paarweiser Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ergab, dass sich IVP-2 signifikant von IVP-1 und MOET unterscheidet ($p < 0,01$).

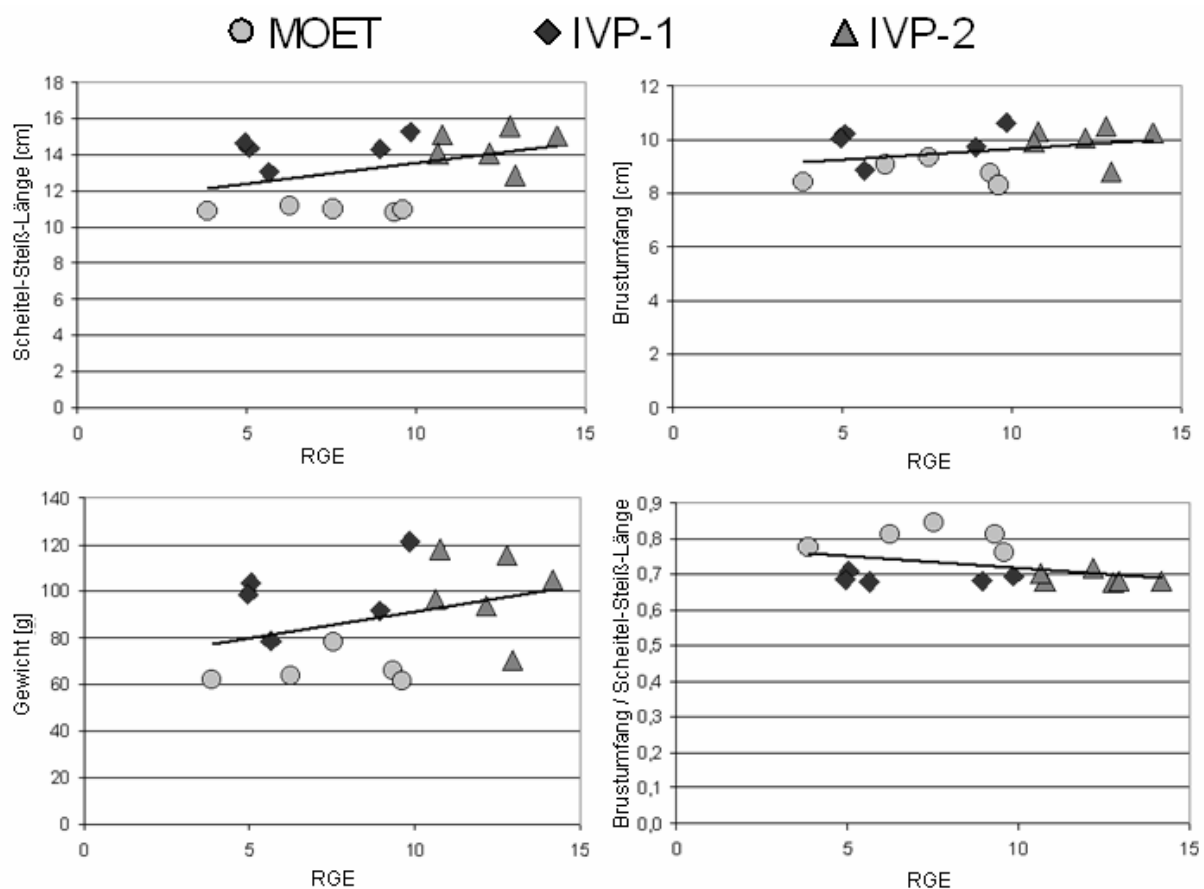


Abb. 4.55: Darstellung der relativen IGF2-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,120$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,191$; RGE zu Gewicht: $p = 0,177$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,163$).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGF2-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie dem Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.55).

4.2.2.3. IGF1-R

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGF1-R-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 192 bp zu sehen (Abb. 4.56).



Abb. 4.56: Qualitativer Nachweis von IGF1-R-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 192 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Die Messung der relativen IGF1-R-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 1,1. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 1,3 bzw. 1,6. Der Einfluss der Versuchsgruppen erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als nicht signifikant ($p = 0,151$; Abb. 4.57).

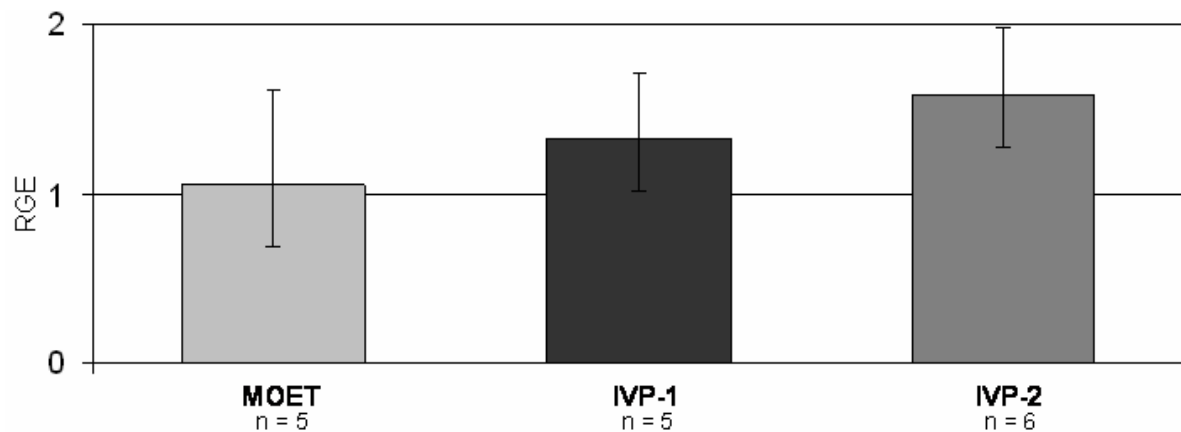


Abb. 4.57: Expression von IGF1-R-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p=0,151$).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGF1-R-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht. Statistisch auffällig war die Korrelation zwischen der relativen IGF1-R-Expression und dem Verhältnis BU/SSL ($p = 0,065$; Abb. 4.58).

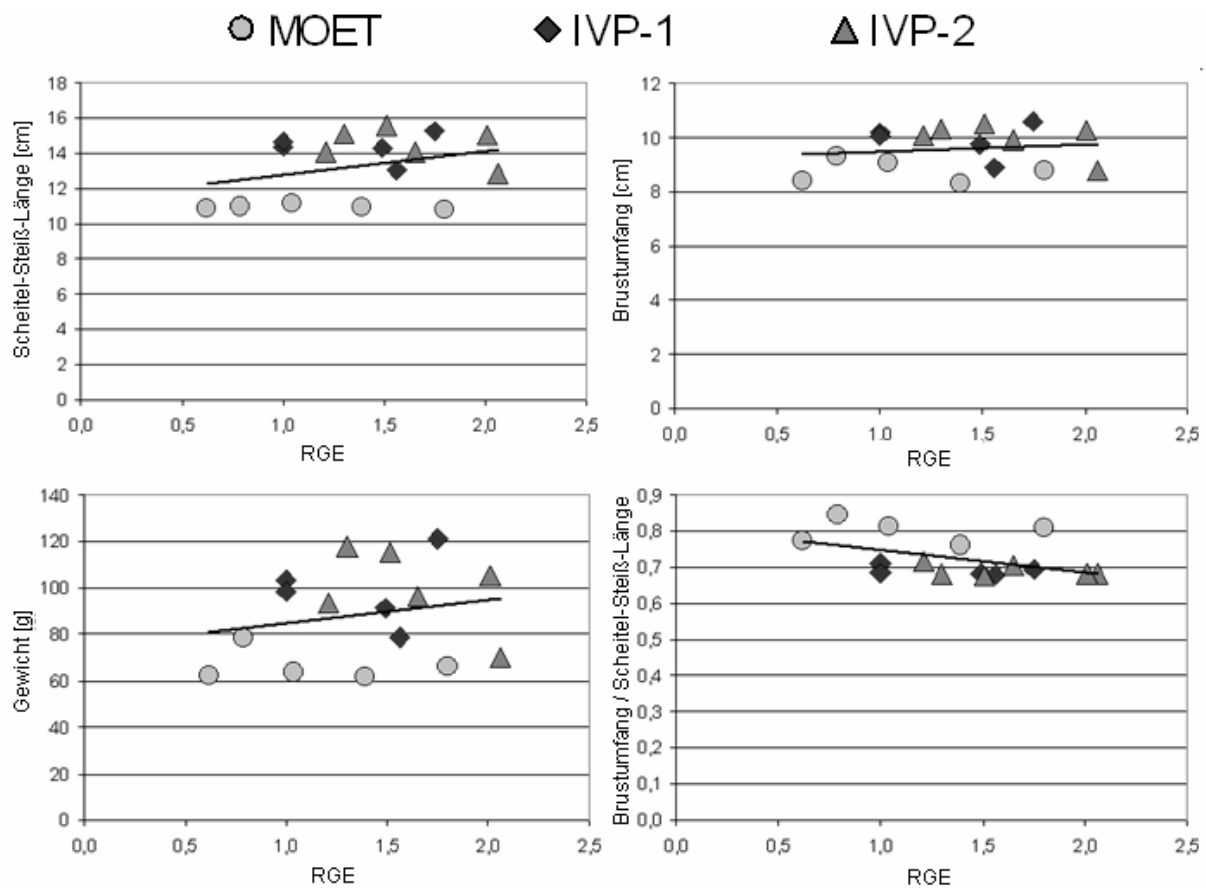


Abb. 4.58: Darstellung der relativen IGF1-R-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,208$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,607$; RGE zu Gewicht: $p = 0,451$). Statistisch auffällig ist die Korrelation zwischen RGE zu BU/SSL ($p = 0,065$).

4.2.2.4. IGF2-R

Die Expression von IGF2-R-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 378 bp zu sehen (Abb. 4.59).



Abb. 4.59: Qualitativer Nachweis von IGF2-R-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 378 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

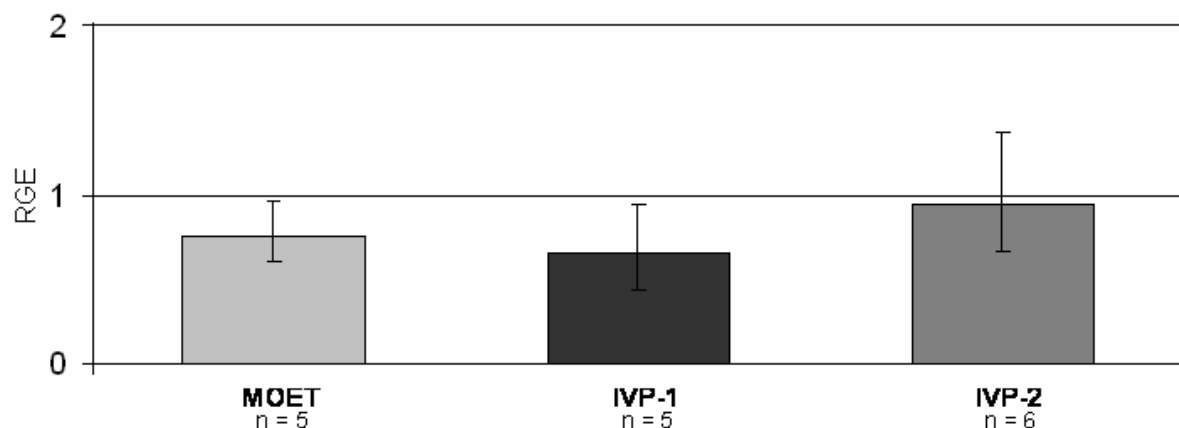


Abb. 4.60: Expression von IGF2-R-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,218$).

Die Messung der relativen IGF2-R-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab für die Gruppen MOET (0,8 mittlerer RGE Wert), IVP-1 (0,7) und IVP-2 (1,0) in der einfaktoriellen ANOVA keinen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,218$; Abb. 4.60).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGF2-R-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie dem Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.61).

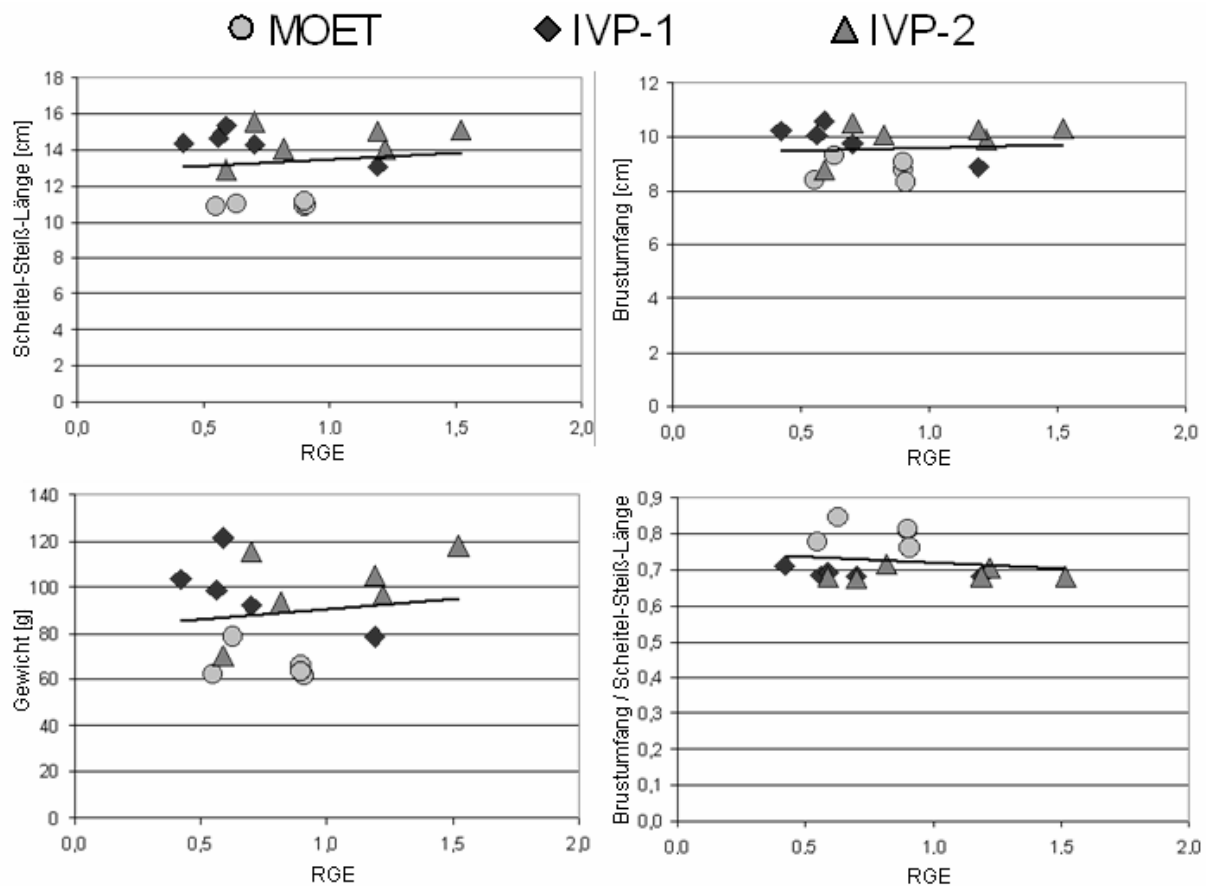


Abb. 4.61: Darstellung der relativen IGF2-R-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,627$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,818$; RGE zu Gewicht: $p = 0,604$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,522$).

4.2.2.5. IGFBP-1

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGFBP-1-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 389 bp zu sehen (Abb. 4.62).

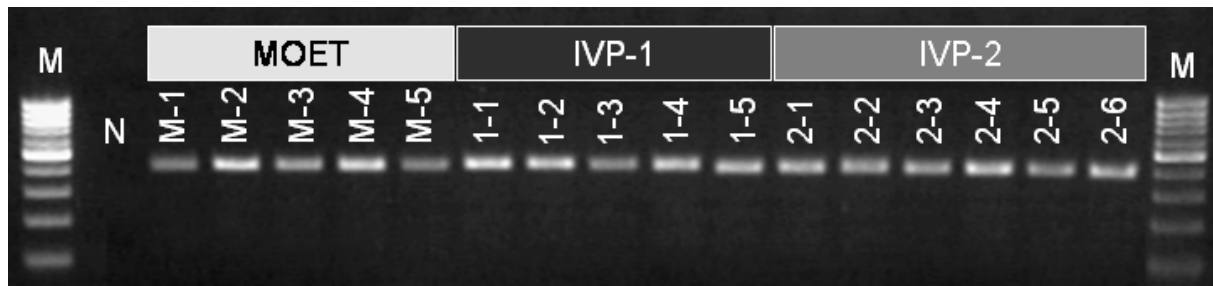


Abb. 4.62: Qualitativer Nachweis von IGFBP-1-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 389 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Die Messung der relativen IGFBP-1-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 1,3. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 0,9 bzw. 2,4. Der Einfluss der Versuchsgruppen erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als signifikant ($p = 0,028$). Ein paarweiser Gruppenvergleich mittels Tukey-Test ergab, dass sich die relative IGFBP-1-mRNA-Expression der Gruppen IVP-1 und IVP-2 signifikant unterschieden ($p < 0,05$). Beide IVP-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant von der MOET-Gruppe (Abb. 4.63).

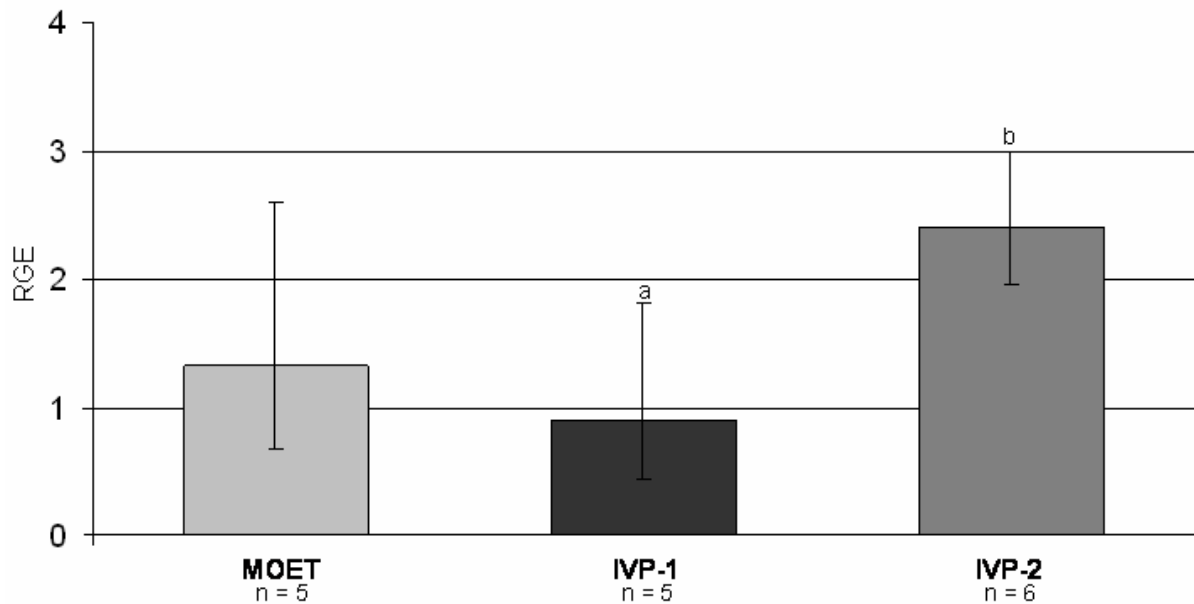


Abb. 4.63: Expression von IGFBP-1-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,028$). Säulen mit unterschiedlicher Markierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; Tukey-Test).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-1-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie dem Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.64).

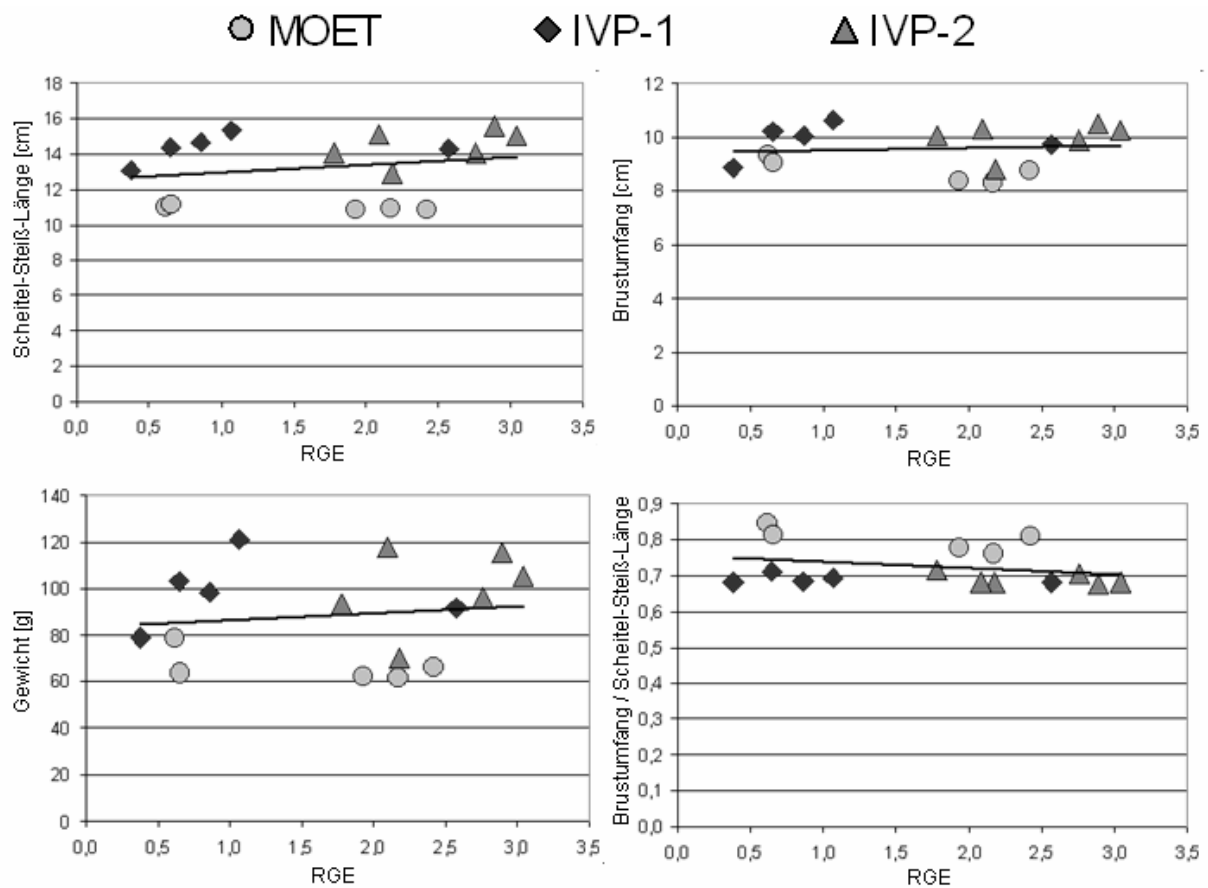


Abb. 4.64: Darstellung der relativen IGFBP-1-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,427$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,720$; RGE zu Gewicht: $p = 0,616$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,291$)

4.2.2.6. IGFBP-2

Die Expression von IGFBP-2-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 278 bp zu sehen (Abb. 4.65).



Abb. 4.65: Qualitativer Nachweis von IGFBP-2-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 278 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Bei der statistischen Auswertung der mittels Real-Time RT-PCR gemessenen relativen IGFBP-2-mRNA-Expression zeigte sich in der einfaktoriellen ANOVA ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p < 0,001$; Abb. 4.66). Die Messung ergab für die MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 14,4. In den beiden IVP-Gruppen wurden signifikant ($p < 0,001$) niedrigere IGFBP-2-mRNA-Expressionen gemessen (IVP-1: 4,1 bzw. IVP-2: 6,1). Die IGFBP-2-Expression der IVP-Gruppen unterschied sich nicht signifikant.

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-2-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL; $p = 0,002$), Brustumfang (BU; $p = 0,023$), Gewicht ($p = 0,020$) sowie dem Verhältnis BU/SSL ($p = 0,001$; Tab. 4.1 und Abb. 4.67).

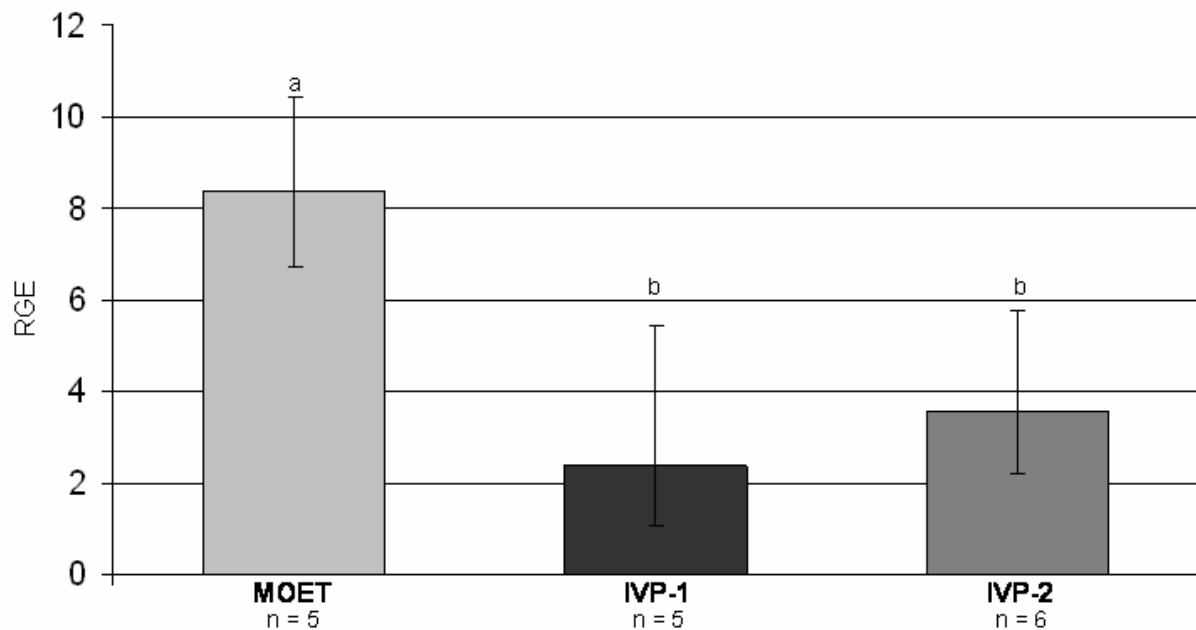


Abb. 4.66: Expression von IGFBP-2-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p < 0,001$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$; Tukey-Test).

Tab. 4.1: Ergebnisse der Analysen bezüglich Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-2-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht (Gew) sowie zum Verhältnis BU/SSL.

| Korrelation mit | Irrtumswahrscheinlichkeit (p) | Korrelationskoeffizient (R) | Gleichung der Regressionsgeraden |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|--|
| SSL (cm) | 0,002 | -0,715 | $y = 15,55 - 0,26x$ |
| BU (cm) | 0,023 | -0,565 | $y = 10,32 - 0,09x$ |
| Gew (g) | 0,020 | -0,574 | $y = 109,48 - 2,38x$ |
| BU/SSL | 0,001 | 0,740 | $y = 0,65 + 0,01x$ |

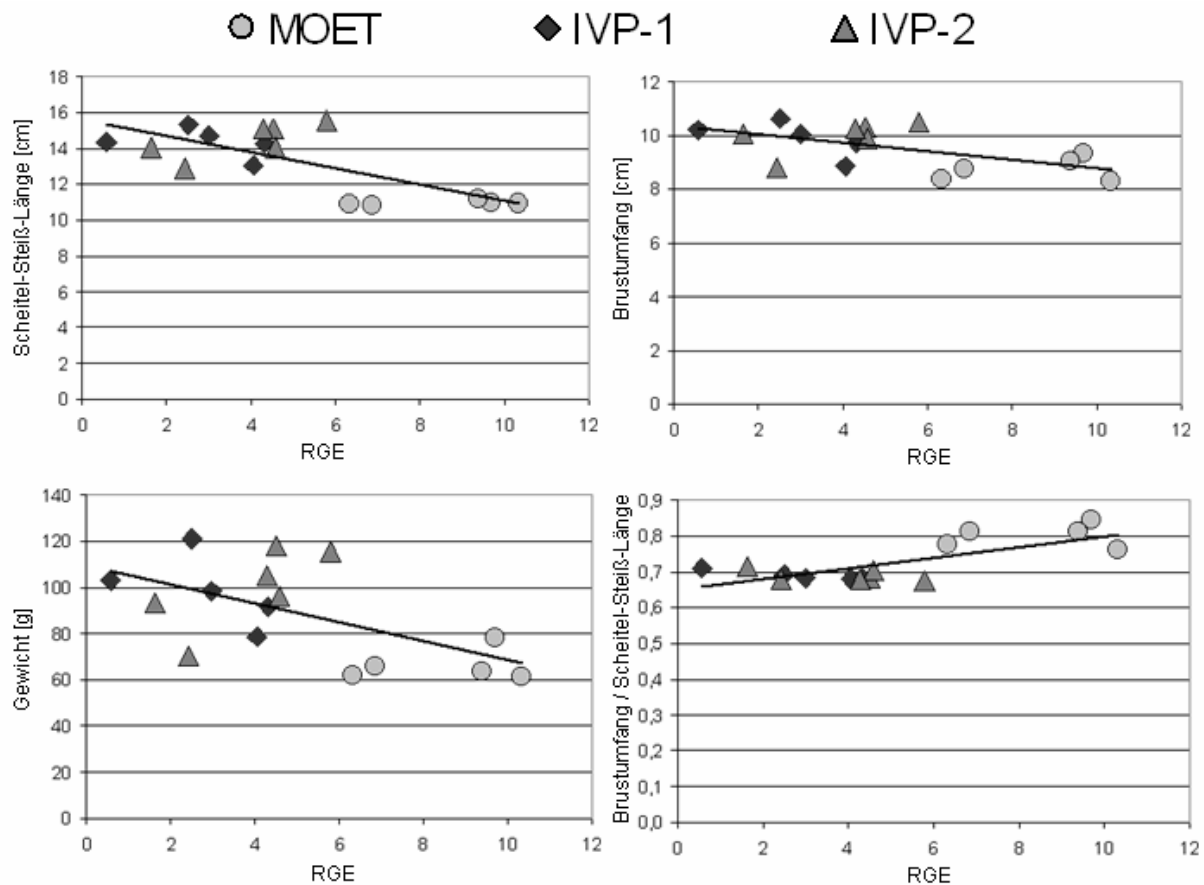


Abb. 4.67: Darstellung der relativen IGFBP-2-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich signifikante Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,002$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,023$; RGE zu Gewicht: $p = 0,020$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,001$).

4.2.2.7. IGFBP-3

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGFBP-3-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 229 bp zu sehen (Abb. 4.68).

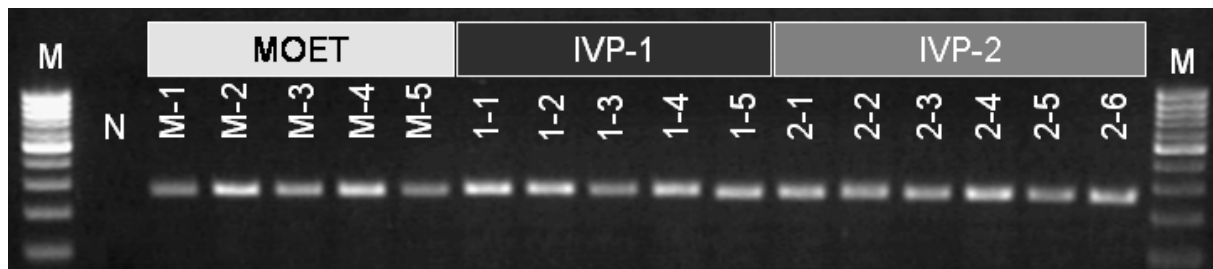


Abb. 4.68: Qualitativer Nachweis von IGFBP-3-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 229 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Die Messung der relativen IGFBP-3-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 12,9. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 7,7 bzw. 8,3. Der Einfluss der Versuchsgruppe erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als signifikant ($p = 0,003$; Abb. 4.69). Die MOET-Gruppe unterscheidet sich signifikant von den beiden IVP-Gruppen (MOET zu IVP-1: $p < 0,01$; MOET zu IVP-2: $p < 0,05$), die sich untereinander nicht signifikant unterscheiden.

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-3-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL; $p < 0,001$), Brustumfang (BU; $p = 0,003$), Gewicht ($p = 0,001$) sowie dem Verhältnis BU/SSL ($p = 0,002$; Tab. 4.2 und Abb. 4.70).

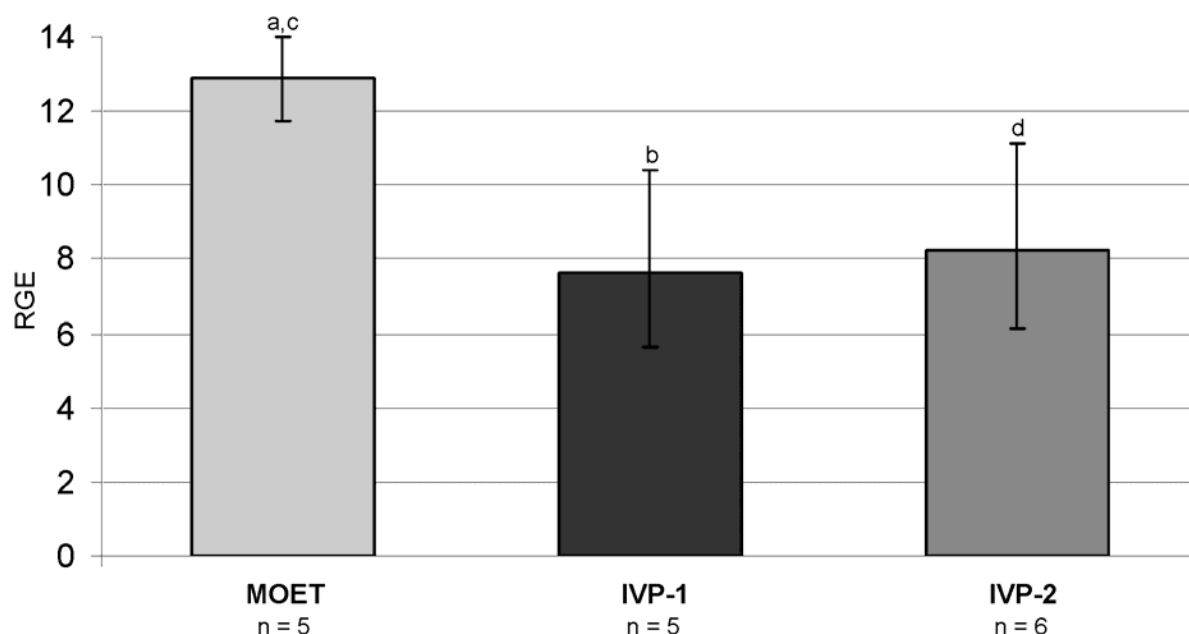


Abb. 4.69: Expression von IGFBP-3-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,003$). Säulen mit unterschiedlichen Markierungen unterscheiden sich signifikant ($a-b = p < 0,01$; $c-d = p < 0,05$; Tukey-Test).

Tab. 4.2: Ergebnisse der Analysen bezüglich Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-3-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht (Gew) sowie zum Verhältnis BU/SSL.

| Korrelation mit | Irrtumswahrscheinlichkeit (p) | Korrelationskoeffizient (R) | Gleichung der Regressionsgeraden |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| SSL (cm) | < 0,001 | -0,801 | $y = 18,08 - 0,49x$ |
| BU (cm) | 0,003 | -0,700 | $y = 11,36 - 0,18x$ |
| Gew (g) | 0,001 | -0,729 | $y = 138,59 - 5,10x$ |
| BU/SSL | 0,002 | 0,710 | $y = 0,59 + 0,01x$ |

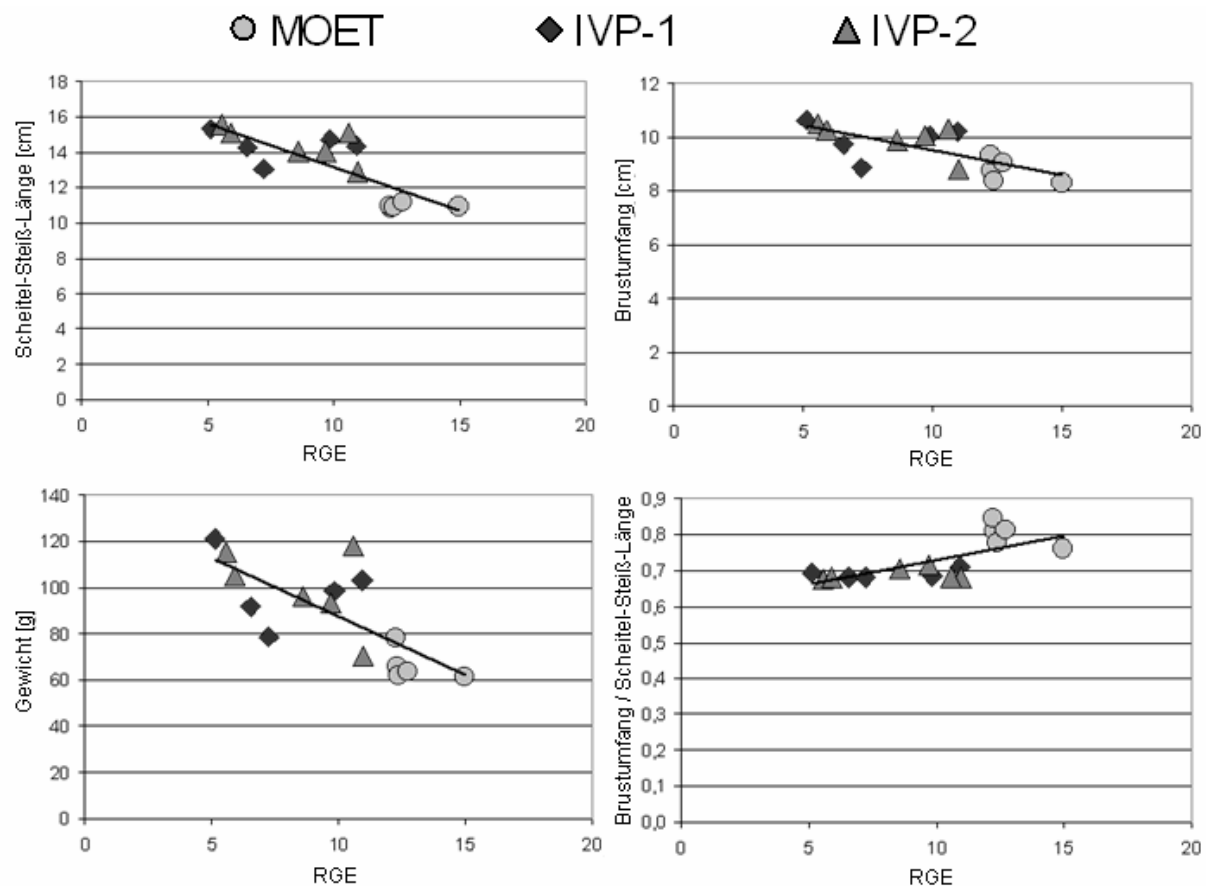


Abb. 4.70: Darstellung der relativen IGFBP-3-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich signifikante Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p < 0,001$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,003$; RGE zu Gewicht: $p = 0,001$; RGE zu BU/SSL $p = 0,002$).

4.2.2.8. IGFBP-4

Die Expression von IGFBP-4-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 427 bp zu sehen (Abb. 4.71).

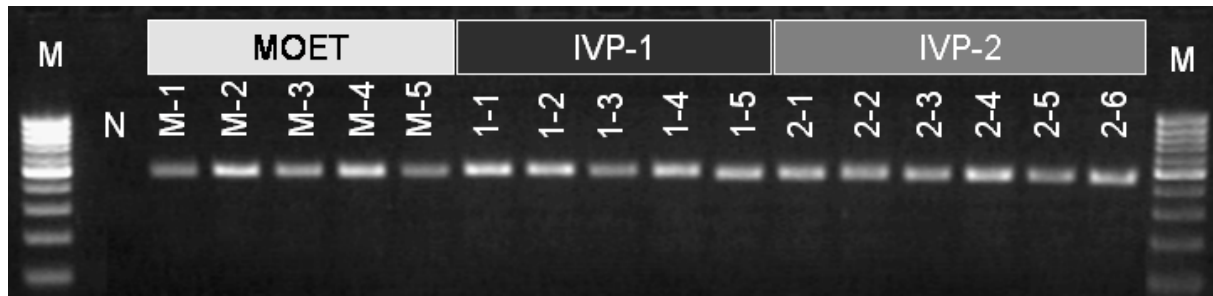


Abb. 4.71: Qualitativer Nachweis von IGFBP-4-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 427 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

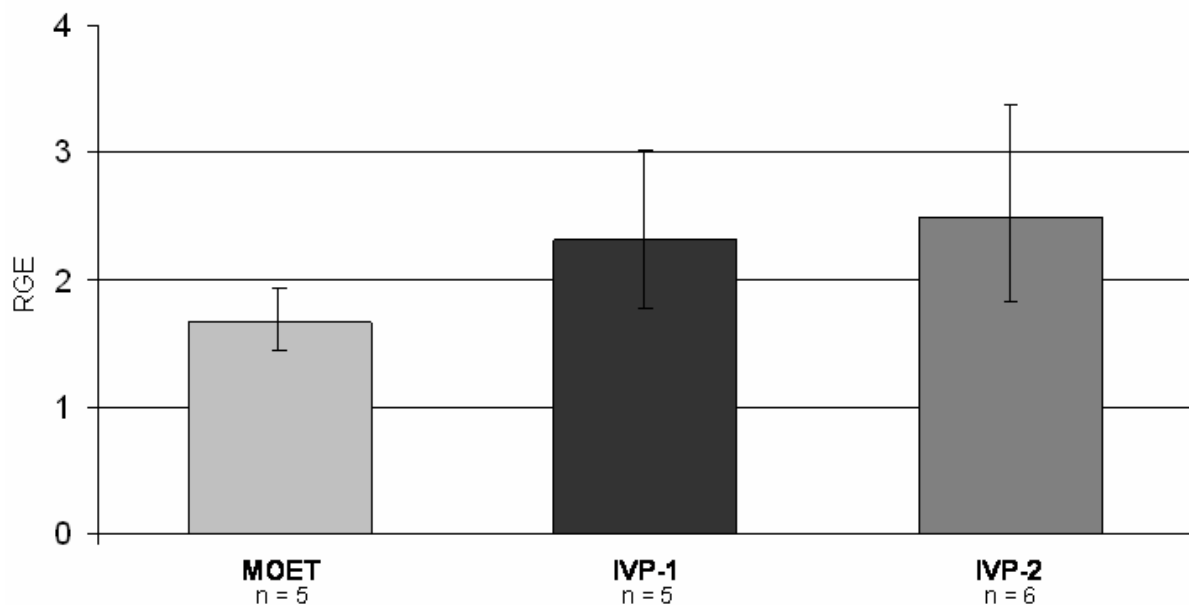


Abb. 4.72: Expression von IGFBP-4-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich ein statistisch auffälliger Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,062$).

Die Messung der relativen IGFBP-4-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab für die MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 1,7. In den beiden IVP-Gruppen wurden höhere IGFBP-4-mRNA-Expressionen gemessen (IVP-1: 2,3 bzw. IVP-2: 2,5). In der einfaktoriellen ANOVA zeigte sich ein statistisch auffälliger Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,062$; Abb. 4.72).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-4-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Brustumfang (BU) und Gewicht. Statistisch auffällig war die Korrelation zwischen der relativen IGFBP-4-Expression und der Scheitel-Steiß-Länge (SSL; $p = 0,075$), signifikant war die Korrelation zwischen RGE und dem Verhältnis BU/SSL ($p = 0,035$; Tab. 4.3 und Abb. 4.73).

Tab. 4.3: Ergebnisse der Analysen bezüglich Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-4-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht (Gew) sowie zum Verhältnis BU/SSL.

| Korrelation mit | Irrtumswahrscheinlichkeit (p) | Korrelationskoeffizient (R) | Gleichung der Regressionsgeraden |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| SSL (cm) | 0,075 | - | - |
| BU (cm) | 0,238 | - | - |
| Gew (g) | 0,186 | - | - |
| BU/SSL | 0,035 | -0,530 | y = 0,83 - 0,05x |

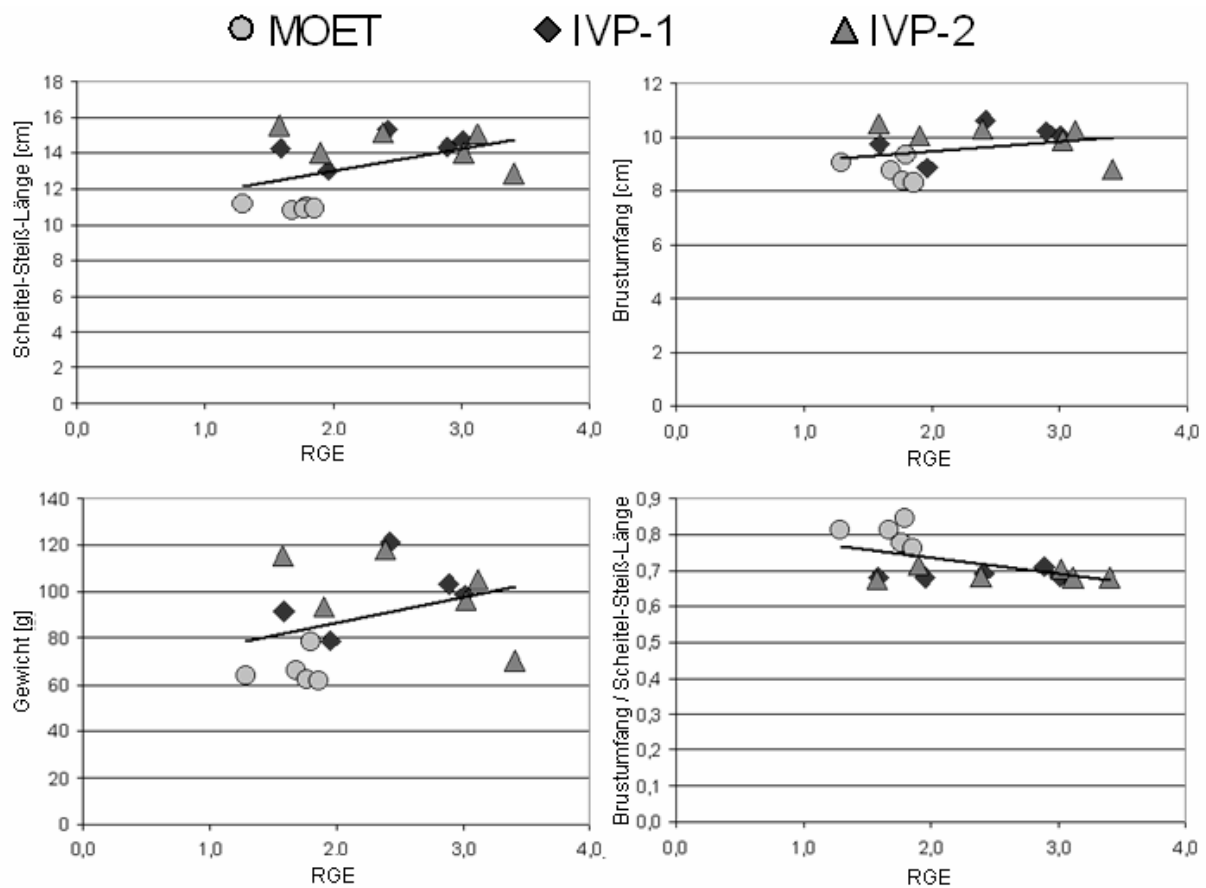


Abb. 4.73: Darstellung der relativen IGFBP-4-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge für RGE zu Brustumfang ($p = 0,238$) und RGE zu Gewicht ($p = 0,286$). Statistisch auffällig ist die Korrelation RGE zu Scheitel-Steiß-Länge ($p = 0,075$), signifikant die Korrelation RGE zu BU/SSL ($p = 0,035$).

4.2.2.9. IGFBP-5

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGFBP-5-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 207 bp zu sehen (Abb. 4.74).

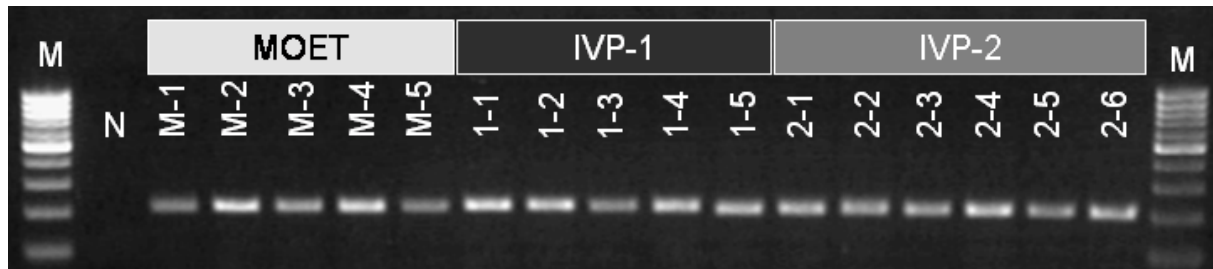


Abb. 4.74: Qualitativer Nachweis von IGFBP-5-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 207 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

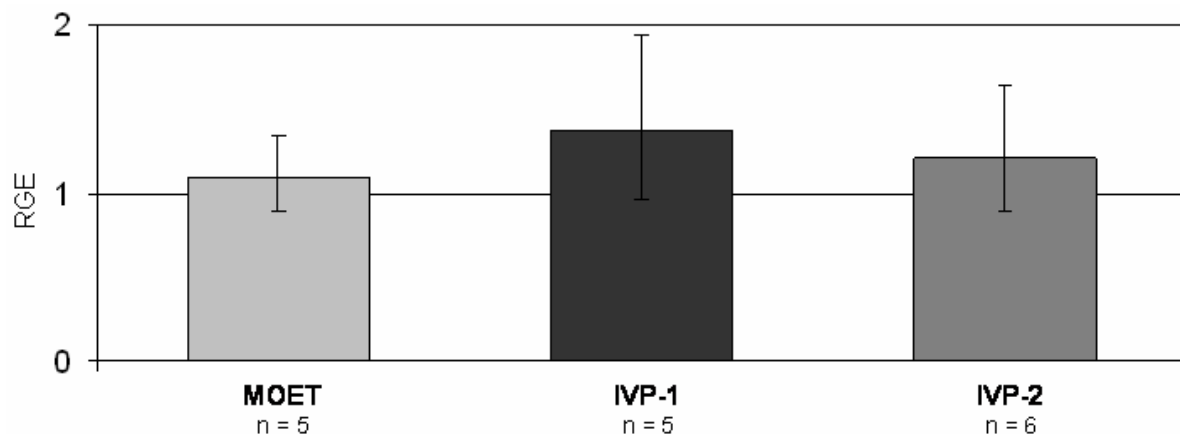


Abb. 4.75: Expression von IGFBP-5-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,410$).

Die Messung der relativen IGFBP-5-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 1,1. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 1,4 bzw. 1,2. Der Einfluss der Versuchsgruppe erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als nicht signifikant ($p = 0,410$; Abb. 4.75).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-5-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie dem Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.76).

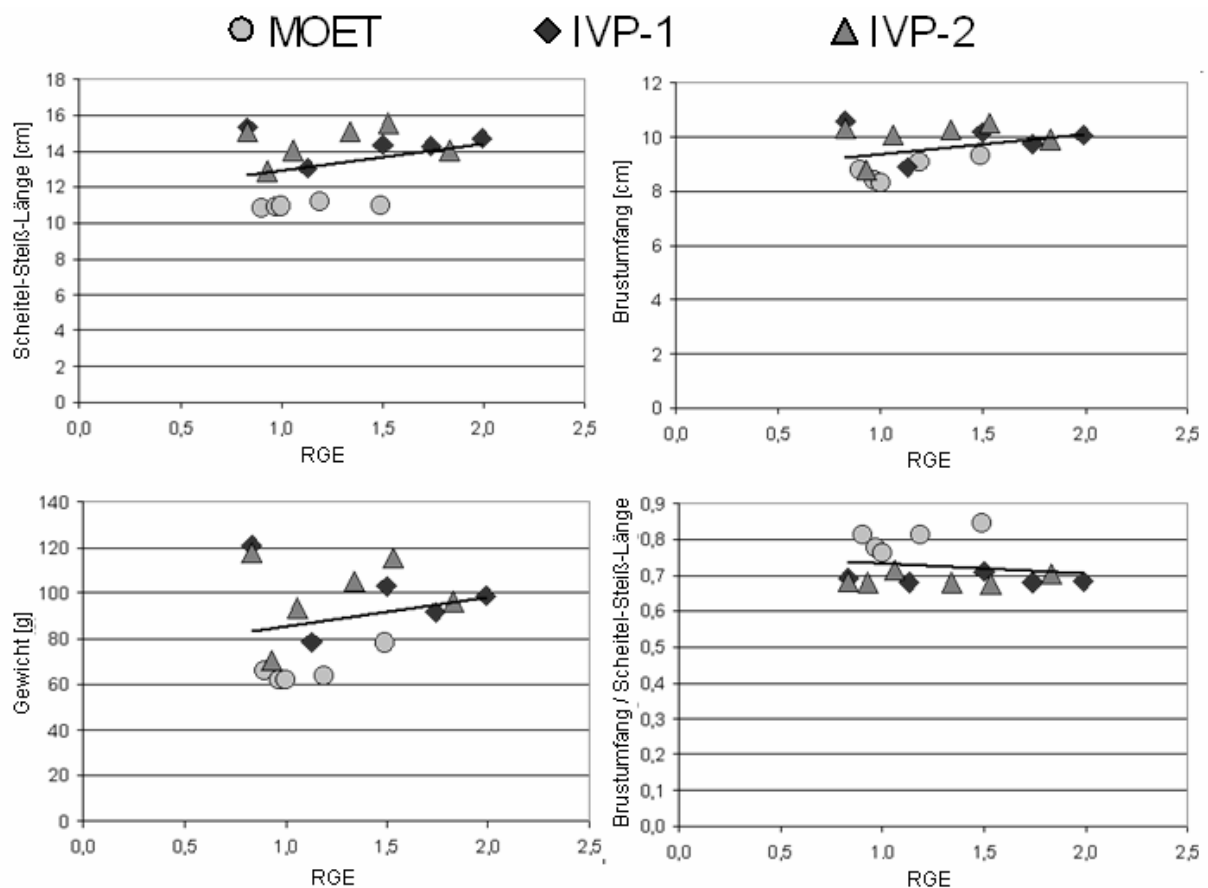


Abb. 4.76: Darstellung der relativen IGFBP-5-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,240$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,188$; RGE zu Gewicht: $p = 0,379$; RGE zu BU/SSL $p = 0,479$).

4.2.2.10. IGFBP-6

Die Expression von IGFBP-6-mRNA konnte mittels konventioneller RT-PCR qualitativ in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 229 bp zu sehen (Abb. 4.77).

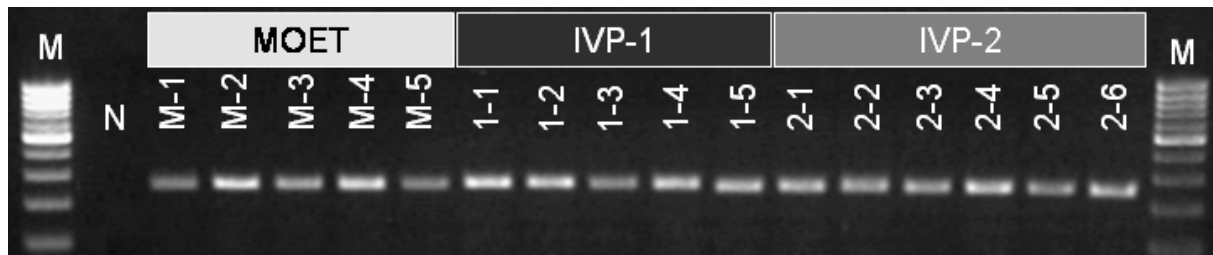


Abb. 4.77: Qualitativer Nachweis von IGFBP-6-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 229 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

Die Messung der relativen IGFBP-6-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab mittlere RGE-Werte von 6,6 (MOET), 9,5 (IVP-1) und 8,7 (IVP-2). In der einfaktoriellen ANOVA zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,214$; Abb. 4.78).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-6-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht. Signifikant war die Korrelation zwischen der relativen IGFBP-6-Expression und dem Verhältnis BU/SSL ($p = 0,025$; Tab. 4.4 und Abb. 4.79).

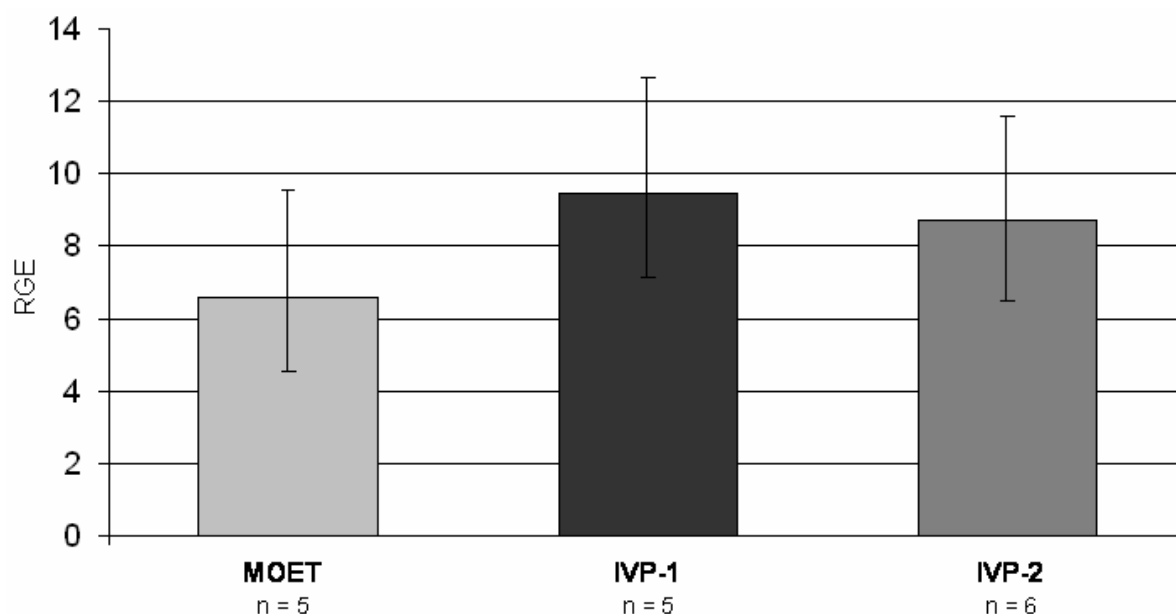


Abb. 4.78: Expression von IGFBP-6-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,214$).

Tab. 4.4: Ergebnisse der Analysen bezüglich Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-6-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht (Gew) sowie zum Verhältnis BU/SSL.

| Korrelation mit | Irrtumswahrscheinlichkeit (p) | Korrelationskoeffizient (R) | Gleichung der Regressionsgeraden |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| SSL (cm) | 0,155 | - | - |
| BU (cm) | 0,640 | - | - |
| Gew (g) | 0,636 | - | - |
| BU/SSL | 0,025 | -0,557 | $y = 0,83 - 0,01x$ |

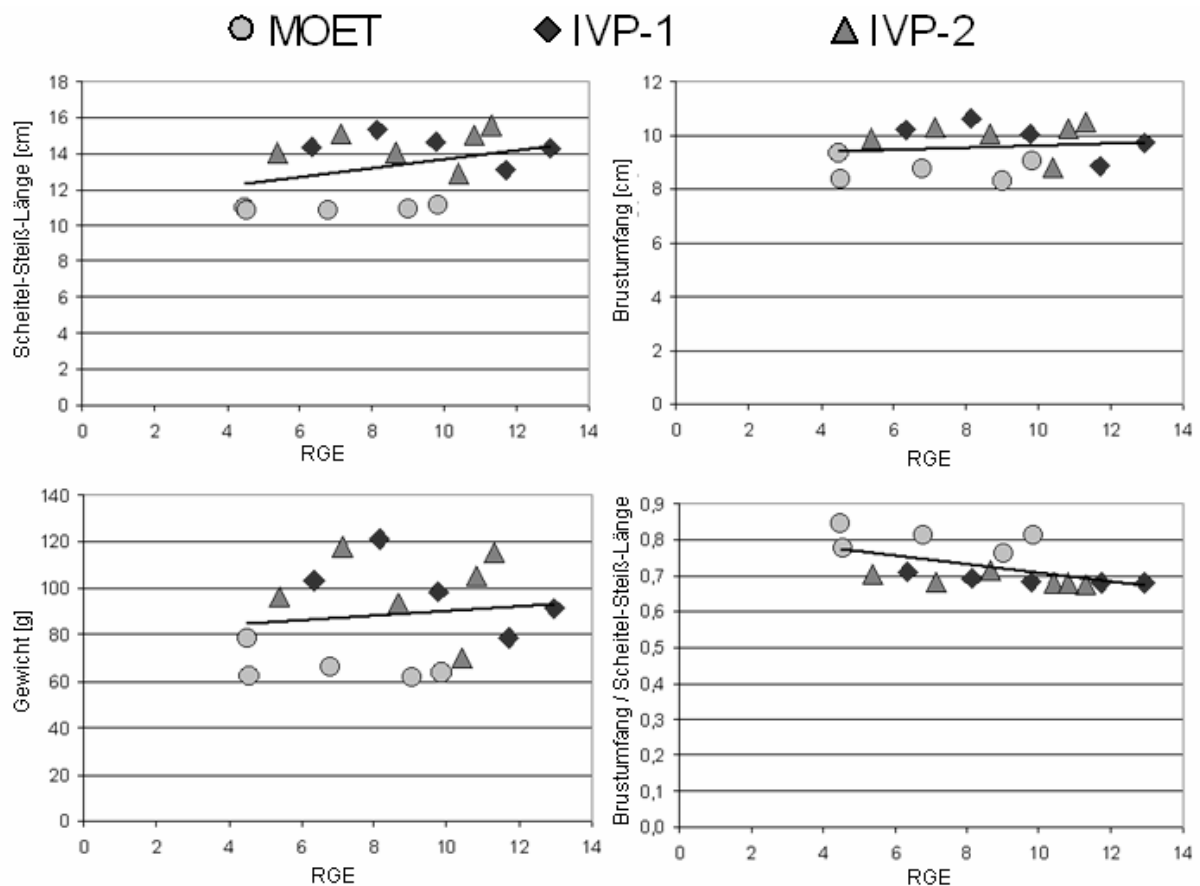


Abb. 4.79: Darstellung der relativen IGFBP-6-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen RGE zu Scheitel-Steiß-Länge ($p = 0,155$), RGE zu Brustumfang ($p = 0,640$) und RGE zu Gewicht ($p = 0,636$). Signifikant ist die Korrelation zwischen RGE zu BU/SSL ($p = 0,025$).

4.2.2.11. IGFBP-7

Mittels konventioneller RT-PCR konnte die Expression von IGFBP-7-mRNA in allen untersuchten Rinderplazentomen aus den Versuchsgruppen MOET, IVP-1 und IVP-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte war jeweils nur eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 220 bp zu sehen (Abb. 4.80).

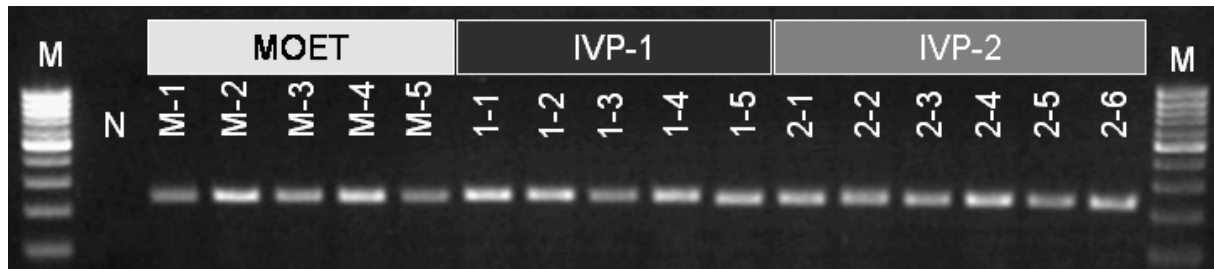


Abb. 4.80: Qualitativer Nachweis von IGFBP-7-mRNA mittels konventioneller RT-PCR. Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese. In allen untersuchten Proben ist eine einzige Bande mit einer Größe von 220 bp zu erkennen. M = 100 bp DNA-Marker; N = negative Kontrolle, RNA durch Wasser ersetzt; M-1 bis M-5 = Plazentome aus konventionellem Embryotransfer; 1-1 bis 2-6 = Plazentome aus zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen.

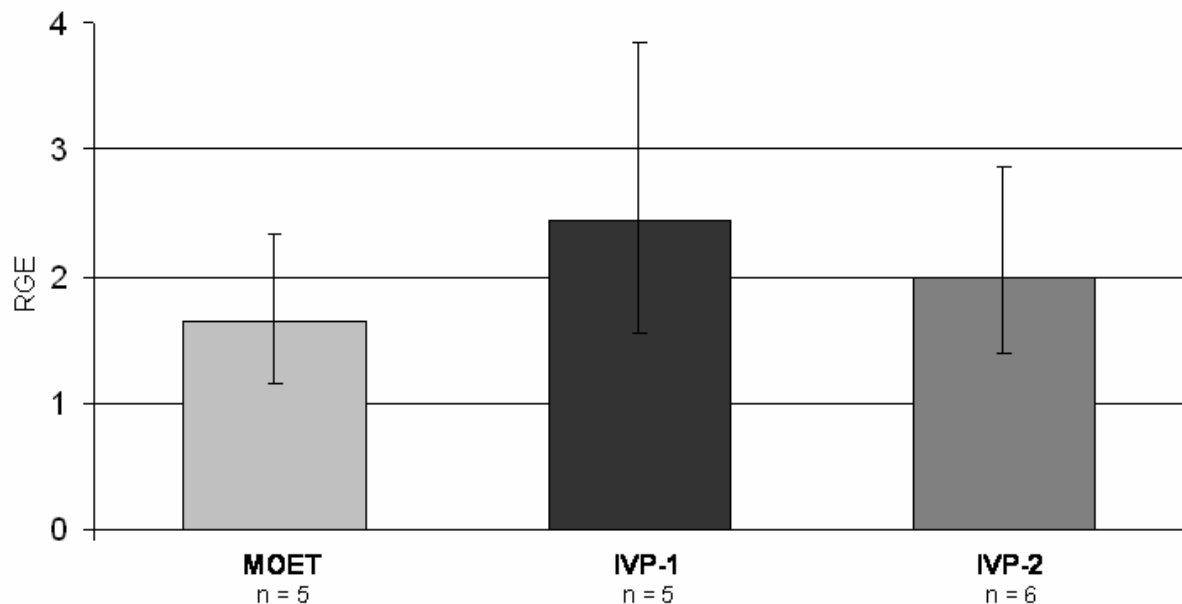


Abb. 4.81: Expression von IGFBP-7-mRNA in Rinderplazentomen von Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer (MOET) und zwei unterschiedlichen IVP-Protokollen (IVP-1 und IVP-2). Dargestellt ist die mittels Real-Time RT-PCR gemessene relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert und einfacher Streubereich. In der einfaktoriellen ANOVA ergab sich kein signifikanter Einfluss der Versuchgruppe ($p = 0,223$).

Die Messung der relativen IGFBP-7-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR ergab in der MOET-Gruppe einen mittleren RGE-Wert von 1,6. In der IVP-1- bzw. in der IVP-2-Gruppe betrugen die mittleren RGE-Werte 2,4 bzw. 2,0. Der

Einfluss der Versuchsgruppe erwies sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse als nicht signifikant ($p = 0,223$; Abb. 4.81).

In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aller untersuchten Trächtigkeiten ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der relativen IGFBP-7-mRNA-Expression in den Plazentomen und den fetalen Größenparametern Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU), Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL (Abb. 4.82).

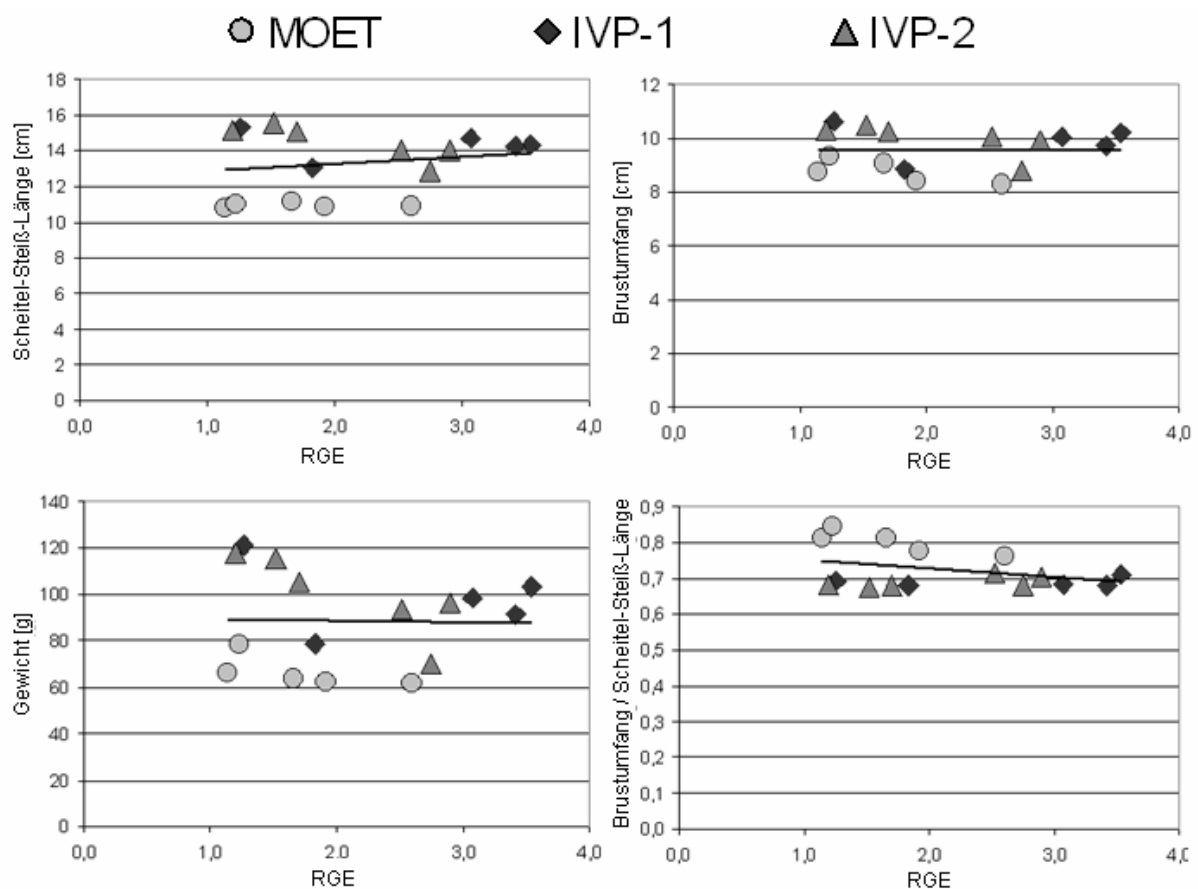


Abb. 4.82: Darstellung der relativen IGFBP-7-mRNA-Expression (RGE) in Plazentomen in Bezug auf die fetalen Größenparameter Scheitel-Steiß-Länge (SSL), Brustumfang (BU) und Gewicht sowie zum Verhältnis BU/SSL. In Korrelationsanalysen unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen (MOET, IVP-1, IVP-2) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge (RGE zu Scheitel-Steiß-Länge: $p = 0,492$; RGE zu Brustumfang: $p = 0,933$; RGE zu Gewicht: $p = 0,900$; RGE zu BU/SSL: $p = 0,164$).

5. DISKUSSION

5.1. Untersuchungsziele

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Real-Time RT-PCR auf Unterschiede in der Expression des IGF-Systems zwischen Plazentomen aus LOS-Trächtigkeiten und der normalen Gravidität zu untersuchen. Die LOS-Trächtigkeiten wurden mittels IVP produziert und die Kontrollgruppe (normale Gravidität) durch Embryotransfer nach Superovulation (MOET) erzeugt. In einem weiteren Schritt sollte auf Korrelationen zwischen der Expression des IGF-Systems in der Plazenta und fetalen Größenparametern untersucht werden. Ziel dieser Analyse war es, Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der plazentaren IGF-System-Expression an der Entstehung des fetalen Überwuchses zu erhalten.

Da grundlegende Informationen zum Vorkommen und zur möglichen Bedeutung des IGF-Systems in den Rinderplazentomen kaum vorlagen, sollte in einem ersten Schritt der vorliegenden Studie das komplette derzeit bekannte IGF-System im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt auf mRNA-Ebene analysiert werden. Die Expression der Liganden (IGF1 und IGF2) und der Rezeptoren (IGF1-R und IGF2-R) wurde zusätzlich durch Immunhistochemie auf Protein-Expression untersucht.

5.2. Methodische Aspekte

Für den immunhistochemischen Nachweis des IGF2-R stand ein Antikörper gegen den bovinen kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-/IGF2-R zur Verfügung, der in zahlreichen vorangegangenen Arbeiten zur Detektion des IGF2-R in der Immunhistochemie und anderen Methoden angewendet worden war (Chen et al., 1997; Sohar et al., 1998; Jadot et al., 1999). Für die übrigen Komponenten des IGF-Systems waren keine gegen das entsprechende Molekül des Rindes erzeugten Antikörper verfügbar. Daher wurden zur immunhistochemischen Darstellung von IGF1, IGF2 und der beiden IGF1-R-Untereinheiten gegen das jeweilige homologe Molekül des Menschen gerichtete Antikörper ausgetestet. Hinsichtlich IGF1 und IGF2 konnte nach den vom Hersteller angegebenen Immunogene (Tab. 3.12) aufgrund der

hohen Homologien der entsprechenden Molekülabschnitte zwischen Mensch und Rind (IGF1 = 94,2%; IGF2 = 80,4%) eine ausreichende Kreuzreaktion erwartet werden. Zur Darstellung des IGF1-R wurde ein gegen den N-Terminus der α -Untereinheit und ein gegen den C-Terminus der β -Untereinheit gerichteter Antikörper ausgetestet. In beiden Fällen wurden vom Hersteller keine weitergehenden Angaben zum jeweiligen Immunogen gemacht. Beim Vergleich der entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden aber auch hier Bereiche mit hoher Homologie zwischen Mensch und Rind gefunden. Dies spricht in Verbindung mit den Resultaten der Negativkontrollen (Austausch der spezifischen Primärantikörper durch unspezifische Kaninchen-Antikörper), in denen keine nennenswerten Farbreaktionen beobachtet wurden dafür, dass mit allen etablierten immunhistochemischen Verfahren die jeweilige IGF-System-Komponente des Rindes spezifisch detektiert wurde.

Im Gegensatz zu mRNA-Expressionstudien an isolierten Zellen wird bei entsprechenden Untersuchungen an komplex aufgebauten Organen ein Signal erfasst, zu dem verschiedene Zelltypen beitragen können, in denen das Zielgen häufig unterschiedlich reguliert wird. Weiterhin kann die Expression eines Gens auch innerhalb bestimmter Zelltypen in einem Organ erhebliche regionale Unterschiede aufweisen. Um die Aussagekraft der eigenen Ergebnisse zu steigern, wurden daher neben den Untersuchungen an Gesamt-Plazentomen auch Untersuchungen an manuell getrennten Kotyledonen- bzw. Karunkelgeweben durchgeführt. Diese wurden, sofern entsprechende Methoden verfügbar waren bzw. etabliert werden konnten, durch immunhistochemische Untersuchungen ergänzt, die primär der Identifizierung Zielgen-exprimierender Zelltypen dienten. In frühen Trächtigkeitsstadien waren aufgrund der empfindlichen Gewebekonsistenz keine geeigneten Präparationen herzustellen, so dass Untersuchungen vor dem 100. Graviditätstag nur an Gesamtplazentomen durchgeführt wurden. Weiterhin ist bei der Interpretation von mRNA-Profilen in „Kotyledonen“ und „Karunkeln“ zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft solcher Daten eingeschränkt ist, wenn die jeweilige Zielgen-mRNA in den reifen Trophoblastriesenzellen exprimiert wird, da diese nach eigener Erfahrung bei der manuellen Trennung des Plazentomes zu einem erheblichen Anteil in der Karunkel-Präparation zu finden sind. Die Kreuzkontamination mit anderen Zelltypen ist dagegen erheblich niedriger und kann bei sauberer Präparation weitgehend vernachlässigt werden.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt

Die konventionelle RT-PCR wies alle Mitglieder des IGF-Systems zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten nach, so dass das komplette IGF-System in den Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität und unter der Geburt exprimiert wird.

IGF1 zeigt auf mRNA-Ebene im ersten Trimester eine hohe Expression im Gesamtplazentom, die im weiteren Verlauf eher auf basalem Niveau liegt. Es lässt sich jedoch im Zeitraum praepartal und unter der Geburt ein leichter Expressionsanstieg erkennen, der sich nach Auftrennung in Kotyledone und Karunkel im maternalen Teil der Plazentome wiederfindet (Kap. 4.1.1.1.) Die IGF1-mRNA-Expression im fetalen Anteil der Plazentome ist quantitativ von untergeordneter Bedeutung. Entsprechend wurden in der Immunhistochemie in den Kotyledonen nur schwache Signale im fetalem Stroma, den Kapillaren und den Trophoblastzellen gefunden (Kap. 4.1.1.2.). Trotz der fehlenden Anfärbungen in den Negativkontrollen (Abb. 4.4.A) ist es jedoch fraglich, in wie weit diesen schwachen Signalen im fetalen Teil der Plazentome tatsächlich eine IGF1-Expression zugrunde liegt. Übereinstimmend mit der quantitativen mRNA-Analyse finden sich die deutlichsten Immunsignale für IGF1 im maternalen Anteil des Plazentoms. In der IHC wurde IGF1 im maternalen Stroma und in den Wänden aller größeren und kleineren Gefäße lokalisiert. Der auf mRNA-Ebene festgestellte signifikante zeitliche Effekt im Verlauf der Gravidität war auf Protein-Ebene jedoch nicht nachweisbar. Dies erklärt sich möglicherweise dadurch, dass das immunhistochemisch vor allem in den Karunkeln gefäßassoziiert nachgewiesene IGF1 zu einem erheblichen Teil nicht lokal in den Plazentomen produziert wird, sondern dem maternalen Blut entstammt, wo es vor allem in der frühen Gravidität in hohen Konzentrationen zirkuliert (Hossner et al. 1997). Eine nahezu ubiquitäre Lokalisation wie von Ravelich et al. (2004) in Karunkeln und Kotyledonen am 50., 100. und 150. Trächtigkeitstag beschrieben, war in der eigenen Untersuchung jedoch nicht nachvollziehbar.

IGF2 zeigt in den Gesamtplazentomen einen Expressionsanstieg der mRNA vom ersten bis zum dritten Trimester, mit einer daran angeschlossenen Plateauphase im praepartalen Zeitraum und unter der Geburt. In den

Untersuchungen an Kotyledonen- bzw. Karunkelgewebe ist zu erkennen, dass dieser Anstieg primär im fetalen Teil des Plazentomes stattfindet (Kap. 4.1.2.1.). Übereinstimmend dazu ist in den Trophoblastriesenzellen und den uninukleären Trophoblastzellen ein signifikanter Anstieg des immunreaktiven Scores im Trächtigkeitsverlauf zu beobachten (Kap. 4.1.2.2.), während er in anderen Zelltypen der Kotyledone sowie in den IGF2-positiven Karunkelzelltypen auf konstantem Niveau bleibt. Hauptsächlich ist IGF2 aber in den fetalen und maternalen Gefäßen lokalisiert. Möglicherweise entstammt auch das gefäßassoziiert nachgewiesene IGF2 überwiegend dem fetalen bzw. maternalen Blut, wo es bei graviden Rindern in hohen Konzentrationen nachweisbar ist (Holland et al., 1997; Hosner et al., 1997). Die konstante maternale Expression auf mRNA-Ebene und der konstante Nachweis auf Proteinebene ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Gluckman und Butler (1983) an Schafplazentomen. Sie fanden in den untersuchten Karunkeln ebenfalls eine konstante IGF2-Konzentration zwischen dem 50.–140. Graviditätstag. Ein Anstieg der IGF2-Expression im Trophoblasten während der Gravidität wurde auch bei Primaten mittels In situ-Hybridisierung beobachtet (Zollers et al., 2001). Eine deutlichere IGF2-mRNA-Expression im fetalen als im maternalen Anteil fanden ebenfalls Reynolds et al. (1997) im Schafplazentom, weiterhin wurde auch eine starke Expression im fetalen Mesoderm festgestellt. In den Karunkeln von Schafen war die IGF2-mRNA-Expression, wie in den eigenen Untersuchungen beim Rind festgestellt, in der frühen Gravidität ebenfalls auf moderatem Niveau. Wie für IGF1 zeigte sich in den immunhistochemischen Untersuchungen von Ravelich et al. (2004) in Rinderplazentomen eine nahezu ubiquitäre Expression von IGF2. Auch dieses war in den eigenen Untersuchungen nicht nachvollziehbar.

Die beiden für die Darstellung des IGF1-R etablierten Verfahren zeigen hinsichtlich der angefärbten Zelltypen ein weitgehend übereinstimmendes Reaktionsmuster, was beide Teilergebnisse prinzipiell gegenseitig bestätigt. Lokalisiert ist das Protein des IGF1-R hauptsächlich in den fetalen und maternalen Kapillaren sowie den größeren Blutgefäßen in der Karunkel (Kap. 4.1.3.2.). Allerdings zeigte sich in den größeren Gefäßen, dass dort die α -Untereinheit fast ausschließlich in der Media nachweisbar war, während die β -Untereinheit primär in der Intima lokalisiert war. Die Ursache für diesen Unterschied ist unklar. Möglicherweise sind die Epitope in den verschiedenen Anteilen der Gefäßwand nicht

gleichermaßen zugänglich oder durch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, z.B. den Liganden, in unterschiedlichem Ausmaß blockiert. Die Proteinlokalisierung in den Kapillaren und größeren Gefäßen deutet auf eine Beteiligung des IGF-Systems bei der Steuerung der Angiogenese und/oder der Regulation von Gefäßfunktion hin. Auch bei der Ratte zeigten Untersuchungen mittels In-situ Hybridisierung die IGF1-R-mRNA in fetalen und maternalen Kapillaren und in den größeren Gefäßen der Plazenta (Zhou und Bondy, 1992). In der Kotyledone und der Karunkel wird die IGF1-R-mRNA auf annähernd identischem Niveau exprimiert. Die mRNA-Expression im Gesamtplazentom ist zweiphasig (Kap. 4.1.3.1.), mit einem Maximum im ersten Trimester, vergleichbar mit IGF1, und einem erneuten Anstieg nach dem zweiten Trimester, ähnlich dem Verlauf von IGF2. Auf Proteinebene waren dagegen keine signifikanten Veränderungen der IGF1-R-Expression im Verlauf der Trächtigkeit zu erkennen.

Bei der Messung der IGF2-R-mRNA war in den Gesamtplazentomen keine Abhängigkeit der Expression von der Beobachtungsgruppe nachweisbar. In der nach Herkunft des Gewebes getrennten Untersuchung wurde im dritten Trimester eine erhöhte Expression in der Karunkel gemessen, wohingegen die Kotyledone eine annähernd gleich bleibende Expression zeigt (Kap. 4.1.4.1.). Immunhistochemisch wurde IGF2-R hauptsächlich in den fetalen und maternalen Kapillaren, aber auch im maternalen Stroma und im Karunkel epithel lokalisiert. In größeren maternalen Gefäßen ist die Expression von untergeordneter Bedeutung (Kap. 4.1.4.2.). Zhou und Boundy (1992) detektierten in ihren Studien bei der Ratte mittels In-situ Hybridisierung IGF2-R-mRNA in allen Anteilen der Plazenta, vor allem im Trophoblast und in den Kapillaren.

Die Messungen der IGFBP-mRNA-Expression in fetalen bzw. maternalen Anteilen der Plazentome weisen teilweise auf erhebliche Expressionsunterschiede zwischen Karunkel und Kotyledone hin. IGFBP-1 und -2 werden fast ausschließlich im maternalen Teil der Plazentome exprimiert. Auch bei IGFBP-3, -4, -6 und -7 ist die Expression in der Karunkel signifikant höher als in der Kotyledone. Lediglich IGFBP-5 zeigt eine nahezu ausschließliche Expression auf der fetalen Seite.

IGFBP-1 weist einen Expressionsanstieg bis unter die Geburt auf, der rein maternalen Ursprungs ist (Kap. 4.1.5.1.). In immunhistochemischen Untersuchungen an Rinderplazentomen am Tag 50 der Gravidität wurden von Ravelich et al. (2004) in

der Kotyledone kein IGFBP-1 auf Proteinebene detektiert, nur am Karunkelstiel zeigten sich deutliche Signale.

Im Gesamtplazentom zeigt IGFBP-2 ein Expressionsmaximum im ersten Trimester. Zu vermuten ist, dass auch dieses Maximum rein karunkulären Ursprungs ist, da bei den ab dem zweiten Trimester durchgeführten Untersuchungen an getrennten Kotyledonen- und Karunkelgewebe die IGFBP-2-Expression praktisch ausschließlich dem maternalen Kompartiment zugeordnet werden konnte (Kap. 4.1.5.2.). In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen auf mRNA-Ebene fanden auch Ravelich et al. (2004) in immunhistochemischen Untersuchungen an Rinderplazentomen am 50. und 100. Tag der Trächtigkeit IGFBP2-spezifische Immunsignale nur im Karunkelstroma. Am 150. Trächtigkeitstag waren diese nicht mehr nachweisbar, was mit dem in den eigenen Untersuchungen festgestellten Verlauf der IGFBP2-mRNA-Expression im entsprechenden Zeitraum prinzipiell im Einklang steht. Reynolds et al. (1997) fanden beim Schaf IGFBP-2-mRNA durch In-situ Hybridisierung erst ab dem 29. Trächtigkeitstag und ausschließlich im Karunkel-ähnlichen Stromabereich unter dem luminalen Uterusepithel. In anderen Uterusbereichen sowie im fetalen Teil der Plazenta war IGFBP-2-mRNA nicht nachweisbar. Der Verlauf der IGFBP2-mRNA-Expression im Gesamtplazentom des Rindes ähnelt sehr der Expression von IGF1-R, welcher jedoch annähernd gleichermaßen in Karunkel und Kotyledonen lokalisiert wurde.

Für IGFBP-3 zeigt sich im Gesamtplazentom kein signifikanter Einfluss der Beobachtungsgruppe. Untersuchungen an getrennten Karunkel- bzw. Kotyledonengewebe ergaben jedoch einen signifikanten Einfluss der Beobachtungsgruppe und der Gewebeherkunft sowie eine signifikante Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren. Hierbei war die IGFBP-3-mRNA-Expression zwischen dem 2. Trimester und der präpartalen Phase in den Karunkeln höher als in den Kotyledonen. Unter der Geburt war das Expressionsniveau in beiden Anteilen der Plazentome annähernd gleich (Kap. 4.1.5.3.). In Schafplazentomen wurde in frühen bis mittleren Stadien der Gravidität mittels In-situ Hybridisierung IGFBP-3-mRNA dagegen ausschließlich in der Karunkel und dort vorwiegend in der Wand von Blutgefäßen lokalisiert (Reynolds et al., 1997).

Die Expression von IGFBP-4-mRNA wies große Ähnlichkeiten mit derjenigen von IGFBP-3-mRNA auf, zeigte aber bei der separaten Erfassung in Karunkel und Kotyledone keinen signifikanten, jedoch einen statistisch auffälligen Zeiteffekt

($p=0.068$). Die IGFBP-4-mRNA-Expression konnte ebenso wie im Fall der IGFBP-3-mRNA primär dem maternalen Anteil der Plazentome zugeordnet werden (Kap. 4.1.5.4.). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Befunden aus Untersuchungen an Schafplazentomen, wo mittels In-situ Hybridisierung IGFBP-4-mRNA in den „dense caruncular-like stroma lining“, im Deutschen Basalplatte der Karunkel, nicht jedoch in den Kotyledonen nachweisbar war (Reynolds et al., 1997).

IGFBP-5 ist das einzige Bindungsprotein, welches in den Rinderplazentomen vorwiegend im fetalen Kompartiment exprimiert wird (Kap. 4.1.5.5.). Hier kommt es im praepartalen Zeitraum und unter der Geburt auf mRNA-Ebene zu einem deutlichen Anstieg der Expression. In den Karunkeln wurde dagegen über den untersuchten Zeitraum eine auf niedrigem Niveau konstante IGFBP-5-mRNA-Expression gemessen. Die Tatsache, dass der prae- und intrapartale Expressionsanstieg bei den Untersuchungen an Gesamtplazentomen deutlich schwächer ausfiel und nicht signifikant war, lässt sich dadurch erklären, dass die Kotyledone bezogen auf die Gewebemasse deutlich weniger zum Aufbau des Plazentomes beiträgt als die Karunkel (Reynolds et al., 1990; Ferrell, 1991). Wathes et al. (1998) wiesen beim Schaf IGFBP-5-mRNA im Uterusepithel nach. Untersuchungen an Plazentomen erfolgten nicht.

IGFBP-6 zeigt zwischen dem zweiten Trimester und dem Graviditätsende sowohl fetal als auch maternal ein Expressionsmaximum unter der Geburt, dieser Anstieg ist fetal früher und kontinuierlicher als in der Karunkel (Kap. 4.1.5.6.). Bei Messungen im Gesamtplazentom wurde allerdings wie für IGF1 die mit Abstand höchste mRNA-Konzentration im ersten Trimester gefunden. Über die Expression von IGFBP-6-mRNA im fetalen oder maternalen Anteil des Plazentomes war bisher nichts bekannt.

Zwischen dem zweiten Trimester und der unmittelbar praepartalen Phase wird IGFBP-7 in der Karunkel deutlich stärker exprimiert als in der Kotyledone. Unter der Geburt wurde in beiden Anteilen des Plazentomes eine gegenüber der vorangegangenen Trächtigkeitsphase erhöhte, nahezu identische Expression gemessen. Auch bei Messungen an Gesamtplazentomen zeigte sich ein Expressionsmaximum unter der Geburt, allerdings war dort der Einfluss der Beobachtungsgruppe nicht signifikant (Kap. 4.1.5.7.). Insgesamt weist auf mRNA-Ebene die Expression von IGFBP-7 sowohl im Gesamtplazentom als auch bei der separaten Erfassung in Karunkeln und Kotyledonen eine große Ähnlichkeit zur

Expression von IGFBP-3 und -4 auf. In der Plazenta und im weiblichen Genitale ist IGFBP-7 bislang nicht untersucht worden, so dass derzeit hierzu keine Daten in der Literatur vorliegen.

IGF1 und IGF2 können nach derzeitigem Kenntnisstand eine Signalkaskade nur über die Bindung an den IGF1-R induzieren, während der IGF2-R offensichtlich der IGF2-Inaktivierung dient (Baker et al., 1993). Immunhistochemisch wurde IGF1-R sowohl im fetalen als auch im maternalen Teil der Plazentome im Gefäßsystem lokalisiert. Nur in den Karunkeln war daneben auch eine nennenswerte, wenn auch deutlich schwächere Expression im Stroma festzustellen. Dieser Befund spricht dafür, dass die Steuerung von Angiogenese und/oder Gefäßfunktionen wichtige Aufgaben des IGF-Systems in der Rinderplazenta darstellen. Aufgrund der überragenden Bedeutung des Gefäßsystems für Wachstum, Differenzierung und Funktionen der Plazenta ist anzunehmen, dass in den Plazentomen des Rindes das IGF-System eine wichtige Rolle spielt. Für einen erheblichen Anteil der untersuchten Mitglieder des IGF-Systems konnten deutliche Veränderungen der Expression im Verlauf der Gravidität festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass diese Faktoren eine über eine rein permissive Funktion hinausgehende, aktive regulatorische Rolle spielen. Die beiden Liganden, IGF1 und IGF2, waren ebenfalls deutlich im fetalen (IGF2) und maternalen (IGF1 und IGF2) Gefäßsystem nachweisbar. Es ist jedoch fraglich, in wieweit das im Gefäßsystem nachgewiesene IGF1 bzw. IGF2 tatsächlich in den entsprechenden Zellen produziert wurde, da Gefäßendothelien allgemein nicht als Syntheseort dieser Faktoren angesehen werden (Fowden, 2003). Möglicherweise liegt diesen Immunsignalen daher Rezeptor- oder IGFBP-gebundenes IGF zugrunde. Als Hauptsyntheseort von IGF1 kann daher in den Plazentomen das Karunkelstroma angesehen werden, während IGF2 vorwiegend im Karunkel- und Kotyledonenstroma sowie in Trophoblasten produziert wird. Eine IGF2-Expression im Trophoblasten wurde auch bei anderen Spezies beschrieben (Reynolds et al., 1997; Han und Carter, 2000; Zollers et al., 2001). IGF2-R wird in den Plazentomen vor allem maternal im Karunkelepithel exprimiert. Da dieser Rezeptor hauptsächlich die Aufgabe hat, IGF2 abzufangen und im Lysosom zu degradieren, ist davon auszugehen, dass das Karunkelepithel einen Schutzwall gegen das in der Kotyledone synthetisierte IGF2 bildet. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass IGF2 durch die invasive bzw. destruktive Aktivität der Trophoblastriesenzellen in erheblichem Umfang ins maternale Kompartiment gelangen kann. Interessant

erscheint hier die Frage, ob die Orte der Invasion oder der Schaffung von Epithellücken zufällig sind, oder ob die invasive/destruktive Aktivität der Trophoblastriesenzellen durch Reize aus der Karunkel, z.B. ausgehend von einer lokalen Hypoxie, beeinflusst wird. Die Co-Lokalisation von IGF1-R und IGF2-R in den Kapillaren deutet auf lokale Mechanismen hin, welche die Verfügbarkeit von freiem aktiven IGF2 in Zielzellen regulieren. Möglicherweise dient die Expression von IGF2-R in den Kapillarendothelien auch dazu, die Passage von IGF2 durch die Kapillarwände einzuschränken (Abb. 5.1.). Es ist zurzeit unklar, ob und in welchem Umfang die Plazentome IGF1 und -2 in die fetale bzw. maternale Zirkulation abgeben oder von dort aufnehmen. Im fetalen und maternalen Blut werden während der Gravidität hohe Konzentrationen an IGF1 und -2 gemessen, wobei sowohl im maternalen als auch im fetalen Blut IGF2 dominiert (Holland et al., 1997; Hossner et al., 2007).

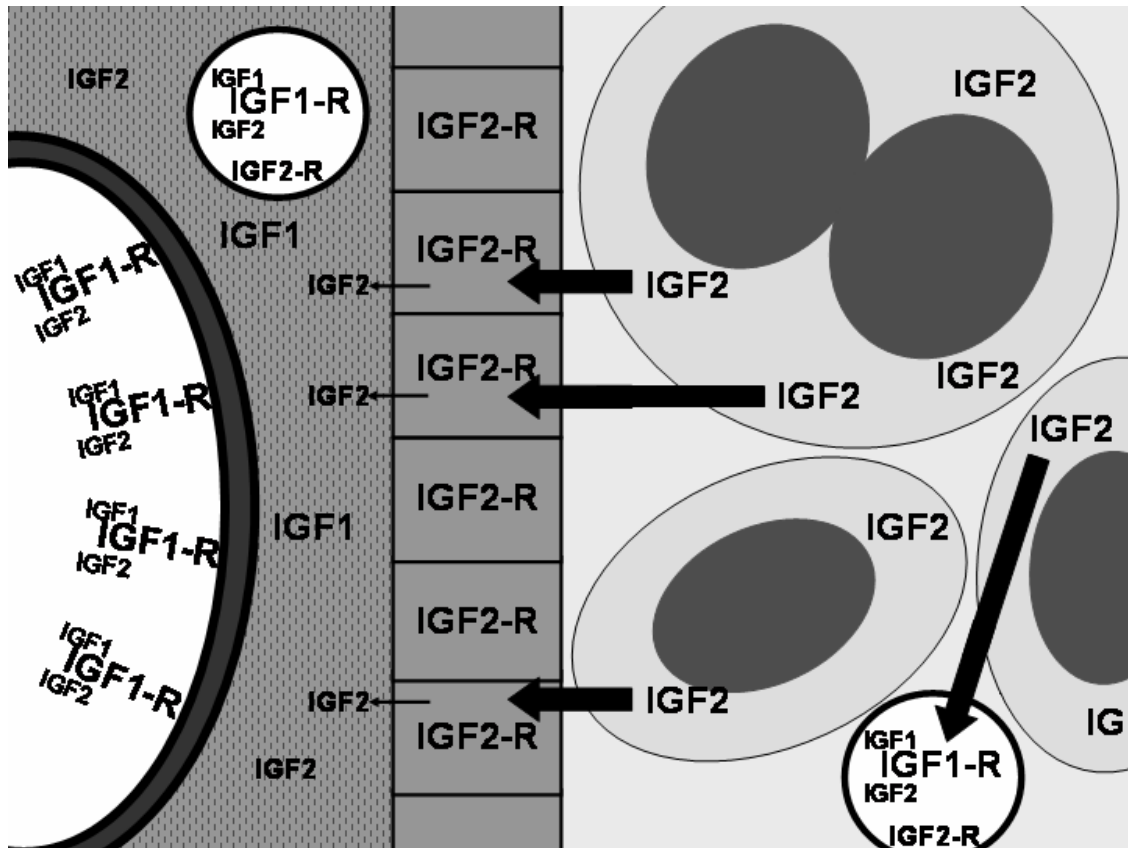


Abb. 5.1: Auf eigenen Befunden basierendes Konzept von Synthese- und Wirkungsorten der IGF-Liganden und -Rezeptoren im Rinderplazentom: Die Wirkung von IGF1 und IGF2 wird über den IGF1-R vermittelt, während IGF2-R der Inaktivierung und Degradierung von IGF2 dient. IGF1 wird in den Plazentomen primär im Karunkelstroma gebildet, sein Wirkungsort sind in erster Linie die maternalen Gefäße und Kapillaren. IGF2 stammt vorwiegend aus den Trophoblasten sowie dem Kotyledonenstroma und entfaltet seine Wirkung im Gefäßsystem der Chorionzotten. Aufgrund der deutlichen IGF2-R-Expression im Karunkelepithel und in den maternalen Kapillaren ist anzunehmen, dass IGF2-R dort den Übertritt vom fetalen ins maternale Kompartiment bzw. die Wirkung auf das maternale Gefäßsystem limitiert. Durch die invasive Aktivität der Trophoblastriesenzellen kann IGF2 dennoch in nennenswerten Umfang in das maternale Kompartiment gelangen. Unklar ist, ob und in welchem Umfang die Plazentome IGF1 und -2 in die fetale bzw. maternale Zirkulation abgeben oder von dort aufnehmen. Hellgrau = Kotyledone mit Trophoblastriesenzellen, uninukleären Trophoblastzellen und fetaler Kapillare; dunkelgrau = Karunkel mit Karunkelepithel, Karunkelstroma (schraffiert), maternalem Gefäß und Kapillare.

5.3.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Trächtigkeiten aus konventionellem Embryotransfer nach Superovulation (MOET) und In vitro-Produktion (IVP)

5.3.2.1 Tierexperiment und Phänotyp der MOET- und IVP-Feten

Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen war die Beobachtung an der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub, dass nach der Anwendung eines bestimmten Protokolls zur in vitro-Produktion von Embryonen (Protokoll IVP-2) gehäuft ein ausgeprägter fetaler Überwuchs auftrat, während Feten, die nach einem weiteren sehr ähnlichen Protokoll erzeugt wurden (IVP-1-Originalmethode), davon weitaus seltener betroffen waren (Hiendleder et al., 2006). Als Ursache der unterschiedlichen LOS-Inzidenzen nach Anwendung der beiden IVP-Protokolle wurde eine unterschiedliche Supplementierung des Mediums zur in vitro-Maturation (IVM) der Oozyten mit Gonadotropinen vermutet (IVP-1: 0,01 U/ml bovines FSH und 0,01 U/ml bovines LH; IVP-2: 0,2 U/ml ovines FSH). Zur Verifizierung dieser Hypothese war daher ursprüngliches Ziel des Tierexperimentes, Rinderfeten nach zwei Protokollen zu produzieren, die sich nur im Gonadotropinzusatz zum IVM-Medium unterschieden. Falls es in diesem Experiment gelungen wäre, die unterschiedliche Häufigkeit des fetalen Überwuchses zwischen beiden Protokollen zu reproduzieren, hätte man dem nur in Protokoll IVP-2 erwarteten LOS-Phänotyp eine recht genau definierte Ursache zuordnen können. Dazu war es erforderlich, die beiden Protokolle in allen anderen Bereichen einander völlig anzugleichen. Ein weiterer Unterschied zwischen der IVP-1-Originalmethode und dem IVP-2-Protokoll (Hiendleder et al., 2006) war neben dem Gonadotropinzusatz zum IVM-Medium die unterschiedliche Supplementierung des Mediums für die in vitro-Kultur (IVC) der Embryonen mit Estrus Cow Serum (ECS) gewesen (IVP-1-Originalmethode: 5%; IVP-2: 10%). Daher wurde in dem der eigenen Arbeit zugrunde liegenden Experiment in beiden IVP-Protokollen einheitlich ein ECS-Zusatz zum IVC-Medium von 10% verwendet. Als Schwerpunkt der eigenen Arbeit innerhalb dieses Projektes war geplant, die Expression des IGF-Systems in den Plazentomen der Versuchstiere zu charakterisieren und auf Zusammenhänge zwischen den erhaltenen Expressionsdaten und dem fetalen Überwuchs zu untersuchen, wobei ein deutlicher

Gruppenunterschied hinsichtlich des Auftretens eines fetalen Überwuchses, wie in den vorangegangenen Untersuchungen beobachtet (Hiendleder et al., 2006), erwartet wurde. Das IGF-System war im Rahmen dieser Untersuchung von besonderem Interesse, da es allgemein eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung spielt und einige seiner Komponenten als imprinted genes identifiziert wurden (Ferguson-Smith et al., 2001; Fowden, 2003). In früheren Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese des LOS waren Hinweise darauf erhalten worden, dass epigenetische Störungen der Expression vor allem von imprinted genes hier eine wichtige Rolle spielen (DeChaira et al., 1990, 1991; Ferguson-Smith und Surani, 2001; Hiendleder et al., 2004a, 2004b).

Überraschenderweise traten in dem den eigenen Untersuchungen zugrunde liegenden Tierexperiment in beiden Gruppen fetaler Überwuchs in gleichem Ausmaß auf. Hinsichtlich der erfassten phänotypischen fetalen Parameter ergaben sich keinerlei signifikante Gruppenunterschiede. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Ursache des in den vorangegangenen Untersuchungen zwischen der IVP-1-Originalmethode und dem IVP-2-Protokoll aufgetretenen ausgeprägten Unterschieds eher in der ECS-Supplementierung des IVC-Mediums als im Gonadotropinzusatz zum IVM-Medium zu suchen ist. Im Gegensatz zum relativ definierten Gonadotropinzusatz des IVM-Mediums handelt es sich bei ECS um ein komplexes Gemisch, dessen im Rahmen der IVP von Rinderembryonen essenziellen bzw. wirksamen Komponenten bisher noch kaum identifiziert wurden. Die Supplementierung des IVC-Mediums mit Serum war bereits früher als Ursache für das Auftreten des LOS bei Schafen und Rindern diskutiert worden. Sie ist aber offensichtlich nicht die einzige Ursache für das LOS bei Trächtigkeiten aus IVP, da Wachstumsstörungen von Fetus und Plazenta auch nach Embryokultur ohne Serumzusatz auftraten (Übersicht bei Miles et al., 2005).

Nachdem sich die ursprüngliche Hypothese als falsch erwiesen hatte, wurde zur Identifizierung und Charakterisierung LOS-assoziiierter Plazentaaberrationen eine LOS-negative Kontrollgruppe mittels Embryotransfer nach Superovulation (MOET) erzeugt. Hierbei wurde darauf geachtet, die Versuchsbedingungen zwischen der MOET-Gruppe und den beiden IVP-Gruppen soweit wie möglich identisch zu gestalten, um die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der eigenen Fragestellung stehende Variabilität der Ergebnisse zu minimieren. Dies betraf

insbesondere den genetischen Hintergrund der Keimzellspender und der Empfängertiere.

Die mittels MOET erzeugten Kontrollfeten unterschieden sich in allen erfassten phänotypischen Merkmalen hochsignifikant von den IVP-Feten. Sie wiesen eine geringere Scheitel-Steiß-Länge (SSL) auf, waren leichter, besaßen einen geringeren maximalen Brustumfang (BU) und einen höheren Quotienten BU/SSL. Der Quotient BU/SSL wird zur Erfassung der beim LOS-Phänotyp auftretenden Veränderungen der Körperproportionen verwendet (Hiendleder et al., 2004a, 2004b, 2006).

Um die Wahrscheinlichkeit einer intakten Gravidität nach der Übertragung von IVP-Embryonen zu erhöhen, wurden pro Empfängertier stets zwei Embryonen übertragen. Da in vielen Fällen hieraus Zwillingsgraviditäten resultieren, wurde als Zeitpunkt der Schlachtung der 80. Graviditätstag gewählt, da in vorangegangenen Untersuchungen zu dieser Trächtigkeitsphase noch kein offensichtlicher Einfluss einer Einlings- bzw. Zwillingsgravidität auf Größe und Gewicht der Feten festgestellt werden konnte, das Auftreten eines fetalen Überwuchses jedoch bereits deutlich zu erkennen war (Hiendleder, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Studie traten jedoch signifikante Unterschiede zwischen Feten aus Einlings- bzw. Zwillingsgraviditäten hinsichtlich der fetalen Parameter SSL, maximaler BU und Gewicht auf, wobei diese Unterschiede vor allem in den IVP-Gruppen deutlich ausgeprägt waren. Da jedoch Zwillingsgraviditäten in allen Versuchsgruppen mit vergleichbarer Häufigkeit vorkamen, ist eine Beeinträchtigung der Aussagefähigkeit des Experiments hinsichtlich des fetalen und plazentaren Wachstums nicht anzunehmen.

Bezüglich der eigenen Ergebnisse wäre es wünschenswert gewesen, die erhaltenen Messeergebnisse auf Beziehungen zu phänotypischen Daten der Plazenta zu untersuchen. Da jedoch parallel zu den eigenen Probenentnahmen Gefäßausguss-Präparate von Plazentomen zur Untersuchung der Gefäßarchitektur hergestellt wurden, konnte aus versuchstechnischen Gründen das Gesamtgewicht bzw. eine Gewichtsverteilung der Plazentome nicht mit der notwendigen Genauigkeit bestimmt werden. Weiterhin war bei Zwillingsgraviditäten aus organisatorischen und Zeitgründen eine Zuordnung der entnommenen Plazentome zu den einzelnen Feten nicht möglich.

5.3.2.2. Expression von Komponenten des IGF-Systems in Rinderplazentomen aus MOET und IVP auf mRNA-Ebene

Die Messung der relativen mRNA-Expression ergab für einen Teil der erfassten IGF-System-Komponenten statistisch signifikante (IGF2, IGFBP-1 bis -3) bzw. auffällige (IGFBP-4) Gruppenunterschiede, wobei für IGFBP-2 bis -4 die Expression in den IVP-Gruppen niedriger (IGFBP-2 und -3) bzw. höher (IGFBP-4) war als in der MOET-Gruppen. Dagegen war für IGF2 die Expression höher in der IVP-2-Gruppe als in der IVP-1- bzw. MOET-Gruppe, während sich für IGFBP-1 der Unterschied zwischen IVP-1 und IVP-2 als signifikant erwies. Weiterhin fanden sich signifikante (IGFBP-2 bis -4 und -6) bzw. statistisch auffällige (IGF1-R) Korrelationen zwischen der mRNA-Expression in den Plazentomen und phänotypischen Daten der Feten. Keinerlei statistisch signifikante oder auffällige Gruppenunterschiede oder Korrelationen fanden sich für IGF1, IGF2-R, IGFBP-5 und IGFBP-7.

Für IGFBP-2 und -3 wurden in beiden IVP-Gruppen signifikant niedrigere ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,003$) mRNA-Expressionen gemessen als in der MOET-Gruppe. Korrelationsanalysen zeigten, dass für diese beiden IGFBP die mRNA-Konzentration in den Plazentomen negativ mit der fetalen Scheitel-Steiß-Länge (SSL), dem maximalen Brustumfang (BU) und dem Gewicht sowie positiv mit dem Verhältnis BU/SSL korrelierten. Dies spricht dafür, dass im eigenen Modell IGFBP-2 und -3 eine Rolle in der LOS-Pathogenese spielen könnten. Der Zusammenhang mit dem fetalen Überwuchs könnte darin bestehen, dass eine verringerte Expression dieser IGFBP zu einer erhöhten Verfügbarkeit von IGF1 und IGF2 führen. Hierdurch könnte das fetale Wachstum indirekt über eine Vergrößerung und/oder Funktionssteigerung der Plazenta stimuliert werden, oder der fetale Überwuchs aus einem vermehrten Übertritt der IGFs aus der Plazenta in die fetale Zirkulation resultieren. In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden fanden Li et al. (2007) bei Kälbern aus SCNT-Graviditäten mit LOS eine signifikant niedrigere IGFBP-2-Expression in der Niere sowie eine tendenziell niedrigere Expression in anderen Organen mit Ausnahme des Gehirns. Im Einklang dazu stehen ebenfalls Befunde aus Untersuchungen an transgenen Mäusen mit einer gesteigerten IGFBP-2-Expression, nach denen eine erhöhte IGFBP-2-Expression zu einer signifikanten Erniedrigung von Körper- und Organgewichten führt (Hoefflich et al., 1999, 2006). Weiterhin wurde bei Schweinefeten mit einer Wachstumsretardation eine signifikant höhere IGFBP-2-

mRNA-Expression im Musculus longissimus dorsi gefunden (Tilley et al., 2007). Ravelich et al. (2004) fanden in Plazentomen aus SCNT-Trächtigkeiten am 50. und 100. Trächtigkeitstag immunhistochemisch eine erhöhte IGFBP-2-Expression im Vergleich zu Plazentomen aus AI- bzw. IVP-Trächtigkeiten, wobei über die Entwicklung und das Auftreten von Anomalien bei den zugehörigen Feten keine Angaben gemacht wurden.

Auch für IGFBP-3 wurde bei Kälbern aus SCNT mit LOS eine niedrigere mRNA-Expression in der Niere gefunden (Li et al., 2007). Entsprechend wurde auch bei Ratten ein Zusammenhang zwischen erhöhten maternalen IGFBP-3-Plasmakonzentrationen und einer Wachstumsrestriktion von Fetus und Plazenta beschrieben (Turgut et al., 2006), und bei wachstumsgehemmten Schweinefeten wurde eine erhöhte IGFBP-3-mRNA-Expression im Musculus longissimus dorsi gemessen (Tilly et al., 2007). Transgene-IGFBP-3-Mäuse mit erhöhter IGFBP-3-Expression zeigten reduzierte Geburts- und Körpergewichte verbunden mit einer relativen Organomegalie von Herz, Lunge sowie Milz und hatten zusätzlich eine gestörte Glucosetoleranz (Silha und Murphy, 2002). In den vergleichenden Untersuchungen von Ravelich et al. (2004) an Plazentomen aus AI-, IVP- und SCNT-Graviditäten wurde am 50., 100. und 150. Trächtigkeitstag auch für IGFBP-3 eine erhöhte Expression in SCNT-Plazentomen festgestellt.

Während IGFBP-2 und -3 in den IVP-Gruppen eine niedrigere Expression im Vergleich zur MOET-Gruppe zeigten, ergab sich für IGFBP-4 tendenziell ein umgekehrter Zusammenhang ($p = 0,062$). Falls IGFBP-4 tatsächlich eine Bedeutung im Rahmen des LOS haben sollte, wäre sie nach den eigenen Ergebnissen nicht über einen einfachen Antagonismus zu den IGFs zu erklären. Hier müssten eine Wirkungssteigerung nach IGF-Bindung bzw. IGF-unabhängige Wirkungen in Betracht gezogen werden. Daten zur IGFBP-4-Expression in der Plazenta des Rindes oder anderer Spezies sind derzeit in der Literatur nicht zu finden. Li et al. (2007) fanden bei SCNT-Kälbern mit LOS-Symptomatik im Vergleich zu einer AI-Kontrollgruppe eine niedrigere Expression in Lunge, Leber und Niere. Im Gehirn war die Expression dagegen erhöht. Demnach ist der Einfluss des SCNT auf die fetale Expression dieses IGFBPs organabhängig.

Gemäß der ursprünglichen Hypothese, dass die unterschiedliche Supplementierungen des IVM-Mediums mit Gonadotropinen zu einer unterschiedlichen Expression wachstums- und differenzierungsrelevanter Gene im Konzeptus führt, ergaben sich signifikante Unterschiede in der IGF2- und IGFBP-1-mRNA-Expression zwischen den Plazentomen aus der IVP-1- und IVP-2-Gruppe, wobei die Expression in der IVP-2-Gruppe jeweils höher war als in der IVP-1-Gruppe. Hinsichtlich des Phänotyps war allerdings zwischen beiden Versuchsgruppen keinerlei Unterschied festzustellen. Falls der in der statistischen Auswertung gefundene Unterschied nicht rein zufallsbedingt war, könnte der fehlende Unterschied im Phänotyp dadurch erklärt werden, dass die Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene nicht zu einer entsprechenden unterschiedlichen Expression auf Proteinebene geführt hat. Weiterhin sind für die Regulation der biologischen Aktivität von IGF2 und IGFBP-1 möglicherweise auch andere Mechanismen bedeutsamer als relativ geringe Schwankungen in der Syntheserate (Kap. 2.2.3.). Vergleichende Untersuchungen zur IGF2-mRNA-Expression in Rinderplazentomen von SCNT-, IVP- und AI-Feten wurden von Moore et al. (2007) durchgeführt. Erstaunlicherweise fanden sie in Plazentomen aus AI-Graviditäten eine signifikant höhere IGF2-mRNA-Expression als in den beiden anderen Gruppen. Ravelich et al. (2004) fanden am 50., 100. und 150. Trächtigkeitstag immunhistochemisch keinen Unterschied in der IGFBP-1-Expression zwischen Plazentomen aus AI, IVP und SCNT. Auch bei SCNT-Kälbern, welche innerhalb von 48 Stunden postpartal verstarben, wurde in keinem der untersuchten Organe ein Unterschied zur Kontrolle aus AI gefunden (Li et al., 2007).

Innerhalb des IGF-Systems nimmt der IGF1-R eine zentrale Position ein, da er sowohl die Effekte von IGF1 als auch von IGF2 vermittelt. Im Mäusefetus erzeugten IGF1-R-Deletionen eine deutliche fetale Wachstumsretardierung, so dass er nur etwa 45% seiner normalen Größe erreicht (Baker et al., 1993). Auch beim Menschen ist eine intrauterine Wachstumsretardierung im Zusammenhang mit einer erniedrigten IGF1-R-Expression bekannt (Laviaola et al., 2004). In den eigenen Untersuchungen war zwar die Korrelation der IGF1-R-mRNA-Konzentration zum Quotienten BU/SSL statistisch auffällig ($p = 0,065$), es ergaben sich jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede sowie Korrelationen der relativen IGF1-R-mRNA-Expression zu Größe und Gewicht des Fetus. Auch bei vergleichenden Untersuchungen zur IGF1-R-Expression an Rinderfeten aus SCNT, IVP und AI ergaben sich keine Gruppenunterschiede (Moore et al., 2007). Dies lässt erkennen, dass die Expression

des IGF1-R-Gens, welches kein imprinted gene ist, unempfindlich gegen Manipulationen im Rahmen biotechnologischer Verfahren ist.

Für IGFBP-6 wurden keine Gruppenunterschiede, jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen der mRNA-Expression in den Plazentomen und dem fetalen BU/SSL-Quotienten gefunden. Die Bedeutung dieses Befundes ist unklar. Über die Expression von IGFBP-6 in der Plazenta des Rindes oder anderer Spezies sowie über eine eventuelle Bedeutung in der Pathogenese des LOS liegen derzeit keine Informationen vor.

5.4. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an einem einheitlichen Probenmaterial die Expression des kompletten IGF-Systems in Rinderplazentomen auf mRNA-Ebene untersucht. Im gleichen Material erfolgte auch die Charakterisierung der Lokalisation von IGF1-, IGF2-, IGF1-R- und IGF2-R-Proteinen als wichtigsten Komponenten dieses Wachstumsfaktoren-Systems. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen deuten auf das fetale und maternale Gefäßsystem als Hauptwirkungsort des IGF-Systems in den Plazentomen hin. Die teilweise signifikanten Expressionsunterschiede im Graviditätsverlauf deuten darauf hin, dass das IGF-System eine aktive regulatorische Rolle in der Steuerung von Entwicklung und/oder Funktionen der Plazentome spielt.

Es wurden zwischen den IVP- und MOET-Gruppen statistisch signifikante Unterschiede in der Expression von IGFBP-2 und -3 in den Plazentomen auf mRNA-Ebene gefunden. Offensichtlich beeinflussen die Kulturbedingungen oder die Manipulationen an den Embryonen im Rahmen der in vitro-Produktion die plazentare Expression dieser Gene. Ein kritischer Parameter ist offensichtlich der Serumzusatz zum IVC-Medium. Ein Zusammenhang zwischen der in den IVP-Plazentomen festgestellten erniedrigten IGFBP-2- und -3-mRNA-Expression und dem fetalen Überwuchs könnten darin bestehen, dass es hierdurch zu einer erhöhten Verfügbarkeit von IGF1 und IGF2 in den Plazentomen kommt. Die Stimulation des fetalen Wachstums könnte direkt durch einen Übertritt dieser Wachstumsfaktoren in den fetalen Kreislauf oder indirekt über eine Erhöhung der plazentaren Stoffwechselfunktion erfolgen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung von biotechnischen Verfahren in der Rinderproduktion, wie z.B. die in vitro-Produktion (IVP) von Embryonen und das somatische Klonen kann zu einem breiten Spektrum embryonaler bzw. fetaler Entwicklungsstörungen führen. Da als besonders auffällige Komponente dieses Syndroms ein ausgeprägter fetaler Überwuchs auftreten kann, werden beim Rind die Biotechnologie-assoziierten Veränderungen allgemein als Large Offspring Syndrome (LOS) bezeichnet. Als weiterer Bestandteil des LOS wurden auch Abnormalitäten im Bereich der Plazenta beobachtet. Die Pathogenese des LOS ist nicht genau geklärt, offensichtlich spielen Störungen epigenetischer Mechanismen in der frühen embryonalen Phase eine bedeutende Rolle. Das Hauptinteresse der Forschung zum LOS lag bisher primär auf den Veränderungen am Embryo bzw. im Bereich des eigentlichen Fetus. Obwohl die Plazenta eine Quelle zahlreicher Wachstumsfaktoren darstellt und aufgrund der Stoffwechselfunktion eine essentielle Rolle für das fetale Wachstum spielt, lagen bisher Untersuchungen zu LOS-assoziierten plazentaren Veränderungen und deren Bedeutung für den fetalen Überwuchs nur in vergleichsweise geringer Anzahl vor.

Schwerpunkt der eigenen Untersuchungen war es daher, die Expression des Insulin-like Growth Factor (IGF)-Systems in Plazentomen aus LOS-Graviditäten und Plazentomen aus Trächtigkeiten mit normaler fetaler Entwicklung zu vergleichen. Das IGF-System wurde als Untersuchungsgegenstand ausgewählt, da diesem allgemein eine bedeutende Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung zugesprochen wird. Da zur Expression und zur Bedeutung des IGF-Systems in den Rinderplazentomen bisher nur sehr vereinzelte, punktuelle Beobachtungen vorlagen, wurde weiterhin dessen Expression im Verlauf der normalen Gravidität charakterisiert.

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung des IGF-Systems in Plazentomen des Rindes:

Mittels konventioneller RT-PCR und Real-Time RT-PCR wurde in den Plazentomen die mRNA-Expression von IGF1, IGF2, der IGF-Rezeptoren (IGF1-R und IGF2-R) und der IGF-Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -7) vom 50. Trächtigkeitstag bis zur Geburt erfasst. Für IGF1, IGF2, IGF1-R (α - und β -

Untereinheit) sowie IGF2-R wurde zusätzlich die Expression mittels Immunhistochemie auf zellulärer Ebene charakterisiert.

- auf mRNA-Ebene war die Expression aller untersuchten IGF-System-Mitglieder in allen untersuchten Plazentomen nachweisbar
- IGF1 zeigt die höchste Expression im ersten Trimester und wird hauptsächlich in der Karunkel exprimiert
- die IGF2-Expression wurde vornehmlich in der Kotyledone nachgewiesen; dort steigt sie im Verlauf der Gravidität bis zur Geburt an
- IGF1-R wird annähernd gleichmäßig in der Kotyledone und der Karunkel exprimiert, während die Expression des IGF2-R im maternalen Anteil der Plazentome deutlich stärker ist als im fetalen
- von den IGFBPs werden IGFBP-1 bis -4, -6 und -7 vornehmlich in der Karunkel exprimiert, nur für IGFBP-5 wurde in den Kotyledonen eine deutlich höhere Expression gefunden als in den Karunkeln
- Für IGF1, IGF2, IGF1-R sowie für die IGFBP-1, -2 und -6 ergab die statistische Auswertung einen signifikanten Einfluss des Trächtigkeitsstadiums auf die Expression in Gesamtplazentomen
- auf Proteinebene waren IGF1, IGF2, IGF1-R und IGF2-R vor allem gefäßassoziiert nachweisbar

Die Tatsache, dass für einen erheblichen Anteil der untersuchten Mitglieder des IGF-Systems deutliche Veränderungen der Expression im Verlauf der Gravidität festgestellt werden konnten, spricht dafür, dass diese Faktoren eine über eine rein permissive Funktion hinausgehende, aktive regulatorische Rolle spielen. Der vornehmlich gefäßassoziierte Nachweis von IGF1 und IGF2 sowie von IGF1-R und IGF2-R lässt erkennen, dass das IGF-System in den Plazentomen besonders für die Steuerung der Angiogenese und/oder in der Regulation von Gefäßfunktionen eine bedeutende Rolle spielt.

Untersuchungen zu Alterationen in der plazentaren Expression des IGF-Systems im Rahmen des LOS nach IVP:

Für die Untersuchungen zur Bedeutung des IGF-Systems im Rahmen LOS-assoziiierter Plazentaveränderungen standen Plazentome aus Trächtigkeiten zur Verfügung, welche nach zwei unterschiedlichen Protokollen der in vitro-Produktion (IVP-1, n = 5; IVP-2, n = 6) erzeugt wurden. Die beiden IVP-Protokolle unterschieden

sich in der Gonadotropin-Supplementierung des Mediums für die in vitro-Oozytenmaturation. Als Kontrolle dienten Plazentome aus 5 Trächtigkeiten, welche durch Embryotransfer nach Superovulation (MOET) erzeugt wurden. Die Probenentnahmen erfolgten am 80. Trächtigkeitstag. Die Feten aus beiden IVP-Protokollen waren signifikant größer und schwerer als die MOET-Kontrollfeten (Scheitel-Steiß-Länge (SSL): IVP-1: $14,2 \pm 0,8$ cm, IVP-2: $14,2 \pm 0,9$ cm, MOET: $10,9 \pm 0,2$ cm; maximaler Brustumfang (BU): IVP-1: $9,8 \pm 0,7$ cm, IVP-2: $9,8 \pm 0,6$ cm, MOET: $8,7 \pm 0,4$; Gewicht: IVP-1: $95,3 \pm 14,1$ g, IVP-2: $95,6 \pm 17,1$ g, MOET: $65,9 \pm 6,4$; Quotient BU/SSL: IVP-1: $0,69 \pm 0,01$, IVP-2: $0,69 \pm 0,02$, MOET: $0,80 \pm 0,03$). Das Probenmaterial sowie die Daten zu Größe und Gewicht der zugehörigen Feten wurden von Herrn Prof. Dr. S. Hiendleder (vormals Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilian-Universität München) zur Verfügung gestellt. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub unter der Leitung von Herrn Dr. H.D. Reichenbach durchgeführt. Die Messung der relativen Genexpression (RGE; Ergebnisdarstellung als geometrischer Mittelwert \times Streufaktor ^{± 1}) erfolgte auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR (Taqman-Sonden Methode).

- von den untersuchten Parametern wurden IGFBP-2 und -3 in den Plazentomen aus beiden IVP-Gruppen signifikant niedriger exprimiert als in der MOET-Kontrollgruppe (IGFBP-2: IVP-1: $4,1 \times 2,3^{\pm 1}$, IVP-2: $6,1 \times 1,6^{\pm 1}$, MOET: $14,4 \times 1,3^{\pm 1}$, $p < 0,001$; IGFBP-3: IVP-1: $7,7 \times 1,4^{\pm 1}$, IVP-2: $8,3 \times 1,3^{\pm 1}$, MOET: $12,9 \times 1,1^{\pm 1}$, $p = 0,003$)
- in den Plazentomen der IVP2-Gruppe war die Expression von IGF2 und IGFBP1 höher als in der IVP1-Gruppe (IGF2: IVP-1 = $6,6 \times 1,4^{\pm 1}$, IVP-2 = $12,2 \times 1,1^{\pm 1}$, $p < 0,01$; IGFBP-1: IVP-1 = $0,9 \times 2,0^{\pm 1}$, IVP-2 = $2,4 \times 1,2^{\pm 1}$, $p < 0,05$)
- unter Einbeziehung der Daten aus allen Versuchsgruppen wurden folgende signifikante Korrelationen zwischen der Genexpression in den Plazentomen und phänotypischen Parametern der Feten (SSL = Scheitel-Steiß-Länge; BU = maximaler Brustumfang, G = fetales Gewicht) ermittelt: IGFBP-2/SSL ($p = 0,002$, $R = -0,715$), IGFBP-2/BU ($p = 0,023$, $R = -0,565$), IGFBP-2/G ($p = 0,020$, $R = -0,574$) IGFBP-2/Quotient BU/SSL ($p = 0,001$, $R = 0,740$); IGFBP-3/SSL ($p < 0,001$, $R = -0,801$), IGFBP-3/BU ($p = 0,003$, $R = -0,700$), IGFBP-3/G ($p = 0,001$, $R = -0,729$) und IGFBP-3/ Quotient BU/SSL ($p = 0,002$, $R = 0,710$)

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es durch die im Rahmen der IVP durchgeführten Manipulationen an Eizellen oder Embryonen zu einer Erniedrigung der IGFBP-2- und -3-mRNA-Expression in den Plazentomen kommt. Ein Zusammenhang zum fetalen Überwuchs könnte in einer verstärkten Verfügbarkeit von biologisch aktiven IGFs bestehen. Eine Beeinflussung des fetalen Wachstums könnte direkt über einen vermehrten Übertritt von IGFs in den fetalen Kreislauf oder indirekt über eine erhöhte Kapazität von Plazentafunktionen erfolgen. Zwischen den beiden IVP-Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede in der placentaren Expression von IGF2 und IGFBP1, jedoch nicht bezüglich der an den Feten erfassten phänotypischen Merkmale. Mögliche Erklärungen hierfür sind fehlende entsprechende Expressionsunterschiede auf Proteinebene oder Kompensation möglicher Effekte durch andere Regelmechanismen. Die Ergebnisse deuten auf eine Bedeutung der placentaren IGFBP-2- und -3-Expression für das fetale Wachstum sowie eine Beteiligung in der Pathogenese des LOS beim Rind hin.

7. SUMMARY

In cattle an increased incidence of various developmental abnormalities has been observed after the use of assisted reproductive techniques (ART) such as in vitro embryo production (IVP) or somatic cell nuclear transfer. As a striking fetal overgrowth may occur as a component of the syndrome, it was named Large Offspring Syndrome (LOS). The pathogenesis of LOS is still widely unclear. However, it is obvious that the disturbance of the epigenetic reprogramming of the genome during early embryonic development plays an important role. Despite the outstanding importance of the placenta for fetal growth and development, research on the aetiology and pathogenesis of LOS so far mainly focused on the blastocyst, embryo or fetus, whereas only a limited number of studies addressed to placental alterations which may also be affected by developmental abnormalities after the use of ART. Thus, the primary aim of this study was to compare the expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in bovine placentomes from normal and LOS pregnancies. The IGF system was chosen as a subject of the study due to its significant role in the control of growth and differentiation. Additionally, the expression of IGF system members was monitored in bovine placentomes during normal gestation and at parturition, as only sparse and punctual information was so far available.

Investigations on the occurrence and role of IGF system members in bovine placentomes during normal gestation and at parturition

Expression of mRNA specific for IGF1, IGF2, IGF receptors (IGF1-R and IGF2-R) and IGF binding proteins (IGFBP) 1-7) was monitored by conventional RT-PCR and real-time RT-PCR in bovine placentomes covering the period from day 50 to parturition. Additionally IGF1, IGF2, IGF1-R (α - and β -subunit) and IGF2-R were immunolocalized and their gestational expression patterns were recorded on the protein level by semiquantitative evaluation of immunostaining.

- mRNA expression of all IGF system members was found in all analysed placentomes
- IGF1 shows the highest expression in the first trimester and is primarily expressed in the caruncles

- IGF2 expression is mainly found in the cotyledons; IGF2-mRNA levels increase during gestation
- IGF1-R-mRNA is expressed at similar levels in cotyledons and caruncles, whereas IGF2-R-mRNA expression is clearly higher in the maternal compared to the fetal part of the placentome
- for IGF1, IGF2, IGF1-R as well as IGFBP-1, -2 and -6 a significant effect of gestational age on mRNA expression in bovine placentomes was found
- in bovine placentomes immunosignals for IGF1, IGF2, IGF1-R and IGF2-R were primarily observed in the vascular system throughout gestation

The fact that for a substantial proportion of IGF system members significant changes of mRNA-levels occurred during gestation and at parturition suggests that they are not only permissive factors but may play active roles in the regulation of placental growth and differentiation. The immunolocalization of IGF1, IGF2, IGF1-R and IGF2-R primarily in the walls of capillaries and blood vessels points to an important role of the IGF system in bovine placentomes for the control of angiogenesis and/or regulation of vascular functions.

Investigations on alterations of IGF system expression in bovine placentomes from LOS pregnancies after IVP:

To investigate the role of the IGF system in the pathogenesis of LOS associated placental alterations, mRNA-levels for IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R and IGFBP1-7 were compared between bovine placentomes from LOS pregnancies and normal pregnancies. LOS pregnancies were generated by two similar IVP protocols (IVP-1, n = 5; IVP-2, n = 6) differing in the gonadotropin supplementation of the medium used for in vitro maturation of oocytes. Five control pregnancies were obtained by conventional embryo transfer after superovulation (MOET). Placentomes were collected on day 80 of gestation. IVP-fetuses were significantly longer and heavier than MOET fetuses (fetal crown rump length (CRL): IVP-1: 14.2 ± 0.8 cm, IVP-2: 14.2 ± 0.9 cm, MOET: 10.9 ± 0.2 cm; fetal weight: IVP-1: 95.3 ± 14.1 g, IVP-2: 95.6 ± 17.1 g, MOET: 65.9 ± 6.4). Moreover, they exhibited a significantly wider maximal thoracic circumference (TC: IVP-1: 9.8 ± 0.7 cm, IVP-2: 9.8 ± 0.6 cm, MOET = 8.7 ± 0.4) and a significantly lower TC/CRL ratio (IVP-1: 0.69 ± 0.01 , IVP-2: 0.69 ± 0.02 , MOET = 0.80 ± 0.03). Placentomal tissue and data on fetal weight and dimensions were provided by Prof. Dr. S. Hiendleder (formerly Institute of Molecular

Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center of the Ludwig-Maximilian University, Munich, Germany). The animal experiments were carried out at the Bavarian Research Station for Animal Breeding, Grub, Germany under the supervision of Dr. H.D. Reichenbach. Real time RT-PCR (Taqman method) was applied for the measurement of relative gene expression, and results are presented as geometric mean x dispersion factor^{±1}.

- in placentomes of both IVP groups IGFBP-2 and -3 were significantly lower expressed than in controls (IGFBP-2: IVP-1: $4.1 \times 2.3^{\pm 1}$, IVP-2: $6.1 \times 1.6^{\pm 1}$, MOET: $14.4 \times 1.3^{\pm 1}$, $p < 0.001$; IGFBP-3: IVP-1: $7.7 \times 1.4^{\pm 1}$, IVP-2: $8.3 \times 1.3^{\pm 1}$, MOET: $12.9 \times 1.1^{\pm 1}$, $p = 0.003$)
- placentomes from IVP-2 pregnancies showed significant higher expression levels of IGF2 and IGFBP-1 than placentomes from IVP-1 pregnancies (IGF2: IVP-1: $6.6 \times 1.4^{\pm 1}$, IVP-2: $12.2 \times 1.1^{\pm 1}$, $p < 0.01$; IGFBP-1: IVP-1: $0.9 \times 2.0^{\pm 1}$, IVP-2: $2.4 \times 1.2^{\pm 1}$, $p < 0.05$)
- pooling data from all experimental groups, the following significant correlations were detected between gene expression in placentomes and parameters on fetal size and weight, respectively (CRL = crown rump length; TC = maximal thoracic circumference; FW = fetal weight): IGFBP-2/CRL ($p = 0.002$, $R = -0.715$), IGFBP-2/TC ($p = 0.023$, $R = -0.565$), IGFBP-2/FW ($p = 0.020$, $R = -0.574$), IGFBP-2/ratio TC/CRL ($p = 0.001$, $R = 0.740$); IGFBP-3/CRL ($p < 0.001$, $R = -0.801$), IGFBP-3/TC ($p = 0.003$, $R = -0.700$), IGFBP-3/FW ($p = 0.001$, $R = -0.729$), IGFBP-3/ratio TC/CRL ($p = 0.002$, $R = 0.710$)

These results suggest that the manipulations of oocytes or embryos by the IVP procedures applied lead to a decrease of IGFBP-2 and -3 mRNA expressions in bovine placentomes, possibly resulting in an increased availability of biologically active IGFs. The stimulation of fetal overgrowth by placental IGF may occur directly by a leakage into the fetal circulation or indirectly by an increase in placental functional capacity. The fact the differences in placental IGF2- and IGFBP1-mRNA expression between the IVP groups were not associated with differences in phenotypic parameters may be explained by a lack of corresponding differences on the protein level or by compensation of differential expression by other regulatory mechanisms. Finally, the results point to a role of placental IGFBP-2 and -3 expressions in the control of fetal growth and in the pathogenesis of LOS in cattle.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abu-Amero, S., Ali, Z., Bennett, P., Vaughan, J. und Moore, G. (1998)** Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births. *Mol Reprod Dev* **49**, 229-235.
- Andresen, A. (1927)** Die Plazentome der Wiederkäuer. *Morph Jahrb* **57**, 410-285.
- Arney, K. (2003)** H19 and Igf2--enhancing the confusion? *Trends Genet* **19**, 17-23.
- Atkinson, B., King, G. und Amoroso, E. (1984)** Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* **30**, 763-774.
- Avner, P. und Heard, E. (2001)** X chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* **2**, 59-67.
- Baker, J., Liu, J., Robertson, E. und Efstratiadis, A. (1993)** Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**, 73-82.
- Barlow, D. (1993)** Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* **260**, 309-310.
- Barton, S., Surani, M. und Norris, M. (1984)** Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**, 374-376.
- Bauer, M., Harding, J., Bassett, N., Breier, B., Oliver, M., Gallaher, B., Evans, P., Woodall, S. und Gluckman, P. (1998)** Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 115-120.
- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R. und Young, L. (2004)** Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* **71**, 185-193.

- Bertolini, M., Mason, J., Sainz, R., Roberts, A. und Anderson, G. (2001)** Association of IGF-1 and IGF-2 with fetal development at days 90 and 180 of gestation for in vivo- and in vitro-derived bovine pregnancies. *Theriogenology* **55**, 347.
- Bertolini, M. und Anderson, G. (2002)** The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* **57**, 181-187.
- Bertolini, M., Mason, J., Beam, S., Carneiro, G., Sween, M., Kominek, D., Moyer, A., Famula, T., Sainz, R. und Anderson, G. (2002)** Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* **58**, 973-994.
- Bertolini, M., Moyer, A., Mason, J., Batchelder, C., Hoffert, K., Bertolini, L., Carneiro, G., Cargill, S., Famula, T., Calvert, C., Sainz, R. und Anderson, G. (2004)** Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine foetuses and association with accelerated conceptus growth. *Reproduction* **128**, 341-354.
- Bestor, T. (2000)** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402.
- Bilby, T., Guzeloglu, A., Kamimura, S., Pancarci, S., Michel, F., Head, H. und WW, T. (2004)** Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci* **87**, 3256-3267.
- Bird, A. und Wolffe, A. (1999)** Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454.
- Bird, A. (2002)** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.

- Björkman, N. (1954)** Morphological and Histochemical Studies on the Bovine Placenta. *Acta Anat (Basel)* **22**, 1-91.
- Björkman, N. und Bloom, G. (1957)** on the Fine Structure of the Foetal-Maternal Junction in the Bovine Placentome. *Zeitschrift für Zellforschung* **45**, 649-659.
- Björkman, N. (1968)** Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *J Ultrastruct Res* **24**, 249-258.
- Boelhaue, M., Sinowatz, F., Wolf, E. und Paula-Lopes, F. (2005)** Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocyst. *Biol Reprod* **73**, 737-744.
- Bohlmann, H. und Havers, W. (1971)** Exomphalos-macroglossia-gigantism syndrome (Wiedemann-Beckwith syndrome) in three siblings. *Arch Kinderheilkd* **183**, 175-182.
- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J. und Viegas-Pequignot, E. (2001)** Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol* **11**, 1542-1546.
- Bushman, T. und Kuemmerle, J. (1998)** IGFBP-3 and IGFBP-5 production by human interstitial muscle: reciprocal regulation by endogenous TGF- β 1. *Am J Physiol* **275**, G1282-1290.
- Calder, M., Caverney, A., Sirard, M. und Watson, A. (2005)** Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. *Fert Steril* **83**, 1077-1085.

- Calder, M., Caverney, A., Westhusin, M. und Watson, A. (2001)** Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expression of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* **65**, 135-140.
- Carr, J., Owens, J., Grant, P., Walton, P., Owens, P. und Wallace, J. (1995)** Circulating insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) and tissue mRNA levels of IGFBP-2 and IGFBP-4 in the ovine fetus. *J Endocrinol* **145**, 545-557.
- Carter, A., Kingston, M., Han, K., Mazzuca, D., Nygard, K. und Han, V. (2005)** Altered expression of IGFs and IGF-binding proteins during intrauterine growth restriction in guinea pigs. *J Endocrinol* **184**, 179-189.
- Charalambous, M., Smith, F., Bennett, W., Crew, T., Mackenzie, F. und Ward, A. (2003)** Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8292-8297.
- Chard, T. (1994)** Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regul* **4**, 91-100.
- Chavatte-Palmer, R., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard, Y., Vignon, X. und Renard, J. (2002)** Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* **66**, 1596-1603.
- Chen, H., Yuan, J. und Lobel, P. (1997)** Systematic Mutational Analysis of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Cytoplasmic Domain. *J Biol Chem* **272**, 7003-7012.
- Clemmons, D. (1997)** Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 45-62.

- Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C. und Reik, W. (2002)** Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* **417**, 945-948.
- Constant, F., Guillomot, M., Heyman, Y., Vignon, X., Laigre, P., Servely, J., Renard, J. und Chavatte-Palmer, P. (2006)** Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* **75**, 122-130.
- Corcoran, D., Rizos, D., Fair, T., Evans, A. und Lonergan, P. (2007)** Temporal expression of transcripts related to embryo quality in bovine embryos cultured from the two-cell to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Mol Reprod Dev* **74**, 972-977.
- Daniels, R., Hall, V. und Trounson, A. (2000)** Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* **63**, 1034-1040.
- Daniels, R., Hall, V., French, A., Korfiatis, N. und Trounson, A. (2001)** Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol Reprod Dev* **60**, 281-288.
- Dantzer, V. und Leiser, R. (1998)** Placentation. In: *Textbook of Veterinary Histology*, Eds: J. Eurell und H. Dellmann, Blackwell, Berlin. pp 279-295.
- Daughaday, W., Parker, K., Borowsky, S., Trivedi, B. und Kapodia, M. (1982)** Measurement of somatomedin related peptides in fetal, neonatal and maternal rat serum by IGF-I RIA, IGF-II RIA and MSA RRA after ethanol extraction. *Endocrinology* **110**, 575-781.

- Davenport, M., Pucilowska, J., Clemmons, D., Lundblad, R., Spencer, J. und Underwood, L. (1992)** Tissue-specific expression of insulin-like growth factor binding protein-3 protease during rat pregnancy. *Endocrinology* **130**, 2505-2512.
- Davis, T., Yang, G., McCarrey, T und Bartolomei M. (2000)** The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parentale alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* **9**, 2885-2889.
- De Meyts, P., Wallace, B., Christoffersen, C., Ursø, B., Grønskov, K., Latus, L., Yakushiji, F., Ilondo, M. und Shymko, R. (1994)** The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res* **42**, 152-169.
- De Meyts, P. und Whittaker, J. (2002)** Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 769-783.
- De Sousa, P., King, T., Harkness, L., Young, L., Walker, S. und Wilmut, I. (2001)** Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetus and placenta. *Biol Reprod* **65**, 20-23.
- Dean, W., Santos, F. und Reik, W. (2003)** Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 93-100.
- DeChiara, T., Efstratiadis, A. und Robertson, E. (1990)** A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78-80.
- DeChiara, T., Robertson, E. und Efstratiadis, A. (1991)** Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849-859.

- D'Ercole, A., Dai, Z., Xing, Y., Boney, C., Wilkie, M., Lauder, J., Han, V. und Clemmons, D. (1994)** Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of igf function in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* **82**, 213-222.
- Devlin, R., Du, Z., Buccilli, V., Jorgetti, V. und Canalis, E. (2002)** Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. *Endocrinology* **143**, 3955-3962.
- Donovan, S., Oh, Y., Pham, H. und Rosenfeld, R. (1989)** Ontogeny of serum insulin-like growth factor binding proteins in the rat. *Endocrinology* **125**, 2621-2627.
- Durham, S., Riggs, B. und Conover, C. (1994)** The insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4)-IGFBP-4 protease system in normal human osteoblast-like cells: regulation by transforming growth factor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 1752-1758.
- Eckstein, F., Pavicic, T., Nedbal, S., Schmidt, C., Wehr, U., Rambeck, W., Wolf, E. und Hoeflich, A. (2002)** Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice. *Anat Embryol (Berl)* **206**, 139-148.
- Eggenchwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P., Tilghman, S. und Efstratiadis, A. (1997)** Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* **11**, 3128-3142.
- Elliott, M. und Maher, E. (1994)** Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **31**, 560-564.

- Engemann, S., Strödicke, M., Paulsen, M., Franck, O., Reinhardt, R., Lane, N., Reik, W. und Walter, J. (2000)** Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting. *Hum Mol Genet* **9**, 2691-2706.
- Fairburn, H., Young, L. und Hendrich, B. (2002)** Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? *Curr Biol* **12**, R68-70.
- Farin, P. und Farin, C. (1995)** Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* **52**, 676-682.
- Farin, P., Crosier, A. und Farin, C. (2001)** Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* **55**, 151-170.
- Farin, P., Piedrahita, J. und Farin, C. (2006)** Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* **65**, 178-191.
- Ferguson-Smith, A., Cattanach, B., Barton, S., Beechey, C. und Surani, M. (1991)** Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* **351**, 667-670.
- Ferguson-Smith, A. und Surani, M. (2001)** Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* **293**, 1086-1089.
- Ferguson-Smith, A., Lin, S., Tsai, C., Youngson, N. und Tevendale, M. (2003)** Genomic imprinting - insights from studies in mice. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 43-49.
- Fernández-Gonzales, R., Moriera, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramirez, M., Rodriguez De Fonseca, F., Pintado, B. und Gutiérrez-Adán A. (2004)** Long-term effect of in vitro culture of mouse embryo with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 5880-5885.

- Ferrel, C. (1991)** Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J Anim Sci* **69**, 1945-1953.
- Fisher, A., Thomas, N., Cockwell, A., Stecko, O., Kerr, B., Temple, I. und Clayton, P. (2002)** Duplications of chromosome 11p15 of maternal origin result in a phenotype that includes growth retardation. *Hum Genet* **111**, 290-296.
- Fowden, A., Szemere, J., Hugher, P., Gilmour, R. und Forhead, A. (1996)** The effect of cortisol on the growth rate of the sheep fetus during late gestation. *J Endocrinol* **151**, 97-105.
- Fowden, A. (2003)** The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* **24**, 803-812.
- Gardner, R., Squire, S., Zainan, S., Hills, S. und Graham, G. (1999)** Insulin-like growth factor-2 regulation of conceptus composition: effects of the trophoctoderm and inner cell mass genotypes in the mouse. *Biol Reprod* **60**, 190-195.
- Garry, F., Adams, R., McCann, J. und Odde, K. (1996)** Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* **45**, 141-152.
- Gay, E., Seurin, D., Babajko, S., Doublier, S., Cazillis, M. und Binoux, M. (1997)** Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology* **138**, 2937-2947.
- Geisert, R., Chamberlain, C., Vonnahme, K., Malayer, J. und Spicer, L. (2001)** Possible role of kallikrein in proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs. *Reproduction* **121**, 719-728.

- Germain-Lee, E., Janicot, M., Lammers, R., Ullrich, A. und Casella, S. (1992)** Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem J* **281**, 413-417.
- Gicquel, C., Rossignol, S., Cabrol, S., Houang, M., Steunou, V., Barbu, V., Danton, F., Thibaud, N., Le Merrer, M., Burglen, L., Bertrand, A., Netchine, I. und Le Bouc, Y. (2005)** Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* **37**, 1003-1007.
- Gilmour, R. (1994)** The implication of insulin-like growth factor mRNA heterogeneity. *J Endocrinol* **140**, 1-3.
- Gluckman, P. und Butler, J. (1983)** Parturition-related changes in insulin-like growth factors-I and -II in the perinatal lamb. *J Endocrinol* **99**, 223-232.
- Gluckman, P. (1995)** Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: *Fetus and Neonat - Volume 3 Growth*, Eds: M. Hanson, J. Spencer and C. Rodeck, Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 97-116.
- Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P. und Ferguson-Smith, A. (2000)** Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5279-5284.
- Grosser, O. (1909)** Die Placentation. In: *Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen*, Ed: O. Grosser, Wilhelm Braumüller, Wien, Leipzig. pp 89-289.
- Grosser, O. (1927)** Vergleichende Placentationslehre. In: *Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere*, Ed: O. Grosser, Verlag von J.F. Bergmann, München. pp 95-174.

- Guler, H., Zapf, J., Schmid, C. und Froesch, E. (1989)** Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh.)* **121**, 753-758.
- Gutt, B., Wowra, B., Alexandrov, R., Uhl, E., Schaaf, L., Stalla, G. und Schopohl, J. (2004)** Gamma-Knife Surgery is Effective in Normalising Plasma Insulin-Like Growth Factor I in Patients with Acromegaly. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**, 219-224.
- Haig, D. und Westoby, M. (1989)** Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. *Am Nat* **134**, 147-155.
- Haig, D. und Graham, C. (1991)** Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor-II receptor. *Cell* **64**, 1045-1046.
- Haig, D. (1997)** Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proc R Soc London Ser* **264**, 1657-1662.
- Haig, D. (2004)** Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet* **38**, 553-585.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J. und Surani, M. (2002)** Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* **117**, 15-23.
- Han, V. und Fowden, A. (1994)** Paracrine regulation fetal growth. In: *Early Fetal Growth and Development*, Eds: R. Ward, S. Smith und D. Donnai, RCOG Press. pp 275-292.
- Han, V. und Carter, A. (2000)** Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta* **21**, 289-305.

- Hasler, J., Henderson, W., Hurtgen, P., Jin, Z., McCauley, A., Mower, S., Neely, B., Shuey, L., Stokes, J., Trimmer, S. (1995)** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* **43**, 141-152.
- Hastie, P., Onagbesan, O. und Haresign, W. (2004)** Co-expression of messenger ribonucleic acid encoding IGF-I, IGF-II, type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci* **84**, 93-105.
- Hatada, I. und Mukai, T. (1995)** Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet* **11**, 204-206.
- Herrler, A., Lucas-Hahn, A. und Niemann, H. (1992)** Effects of insulin-like growth factor-1 on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* **37**, 1213-1224.
- Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X. und Renard, J. (2002)** Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* **66**, 6-13.
- Heyman, Y., Richard, C., Rodriguez-Martinez, H., Lazzari, G., Chavatte-Palmer, P., Vignon, X. und Galli, C. (2004)** Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells* **6**, 111-120.
- Heyman, Y. (2005)** Nuclear Transfer: a new tool or reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev* **45**, 353-361.
- Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., Lyko, F. und Wolf, E. (2004a)** Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* **71**, 217-223.

- Hiendleder, S., Prelle, K., Bruggerhoff, K., Reichenbach, H., Wenigerkind, H., Bebbere, D., Stojkovic, M., Muller, S., Brem, G., Zakhartchenko, V. und Wolf, E. (2004b)** Nuclear-cytoplasmic interactions affect in utero developmental capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biol Reprod* **70**, 1196-1205.
- Hiendleder, S., Bebbere, D., Zakhartchenko, V., Reichenbach, H., Wenigerkind, H., Ledda, S. und Wolf, E. (2004c)** Maternal-fetal transplacental leakage of mitochondrial DNA in bovine nuclear transfer pregnancies: potential implications for offspring and recipients. *Cloning Stem Cells* **6**, 150-156.
- Hiendleder, S., Wirtz, M., Mund, C., Klempt, M., Reichenbach, H., Stojkovic, M., Weppert, M., Wenigerkind, H., Elmlinger, M., Lyko, F., Schmitz, O. und Wolf, E. (2006)** Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic Cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses. *Biol Reprod* **75**, 17-23.
- Hill, D. (1990)** Relative abundance and molecular size of immunoreactive insulin-like growth factors I and II in human fetal tissues. *Early Hum Dev* **21**, 49-58.
- Hill, D., Petrik, J. und Arany, E. (1998)** Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care* **21**, B60-69.
- Hill, J., Roussel, A., Cibelli, J., Edwards, J., Hooper, N., Miller, M., Thompson, J., Looney, C., Westhusin, M., Robl, J. und Stice, S. (1999)** Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* **51**, 1451-1465.
- Hill, J., Burghardt, R., Jones, K., Long, C., Looney, C., Shin, T., Spencer, T., Thompson, J., Winger, Q. und Westhusin, M. (2000)** Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* **63**, 1787-1794.

- Hill, J., Edwards, J., Sawyer, N., Blackwell, C. und Cibelli, J. (2001)** Placental anomalies in a viable cloned calf. *Cloning* **3**, 83-88.
- Hitchins, M., Monk, D., Bell, G., Ali, Z., Preece, M., Stanier, P. und Moore, G. (2001)** Maternal repression of the human GRB10 gene in the developing central nervous system; evaluation of the role for GRB10 in Silver-Russell syndrome. *Eur J Hum Genet* **9**, 82-90.
- Hoeflich, A., Reichenbach, H., Schwartz, J., Grupp, T., Weber, M., Foll, J. und Wolf, E. (1999)** Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. *Domest Anim Endocrinol* **17**, 39-51.
- Hoeflich, A., Bünger, L., Nedbal, S., Renne, U., Elmlinger, M., Blum, W., Bruley, C., Kolb, H. und Wolf, E. (2004)** Growth selection in mice reveals conserved and redundant expression patterns of the insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol* **136**, 248-259.
- Hoeflich, A., Lahm, H. und Wolf, E. (2006)** Molekulare Mechanismen der Wachstumswirkung des IGF-Systems. In: *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, Herausgeber: D. Ganten, K. Ruckpaul und J. Körle, Springer-Verlag, Berlin, Hannover.
- Hoffmann, B (1994)** Gravidität, Geburt und Puerperium. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, Herausgeber: F. Döcke, Enke-Verlag, Jena und Stuttgart. pp 509 - 546.
- Hoffmann, B. und Büttner, G. (1998)** Biochemical an immunohistochemical investigations on the occurrence of the estrogen receptor in the canine uterus during the oestrus cycle. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106 (Suppl. 1)**, 42.
- Hoffmann, B. und Schuler, G. (2002)** The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* **23**, 309-320.

- Holland, M., Hossner, M., Williams, S., Wallace, C., Niswerder, G. und Odde, K. (1997)** Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle: fetal profiles. *Domest Anim Endocrinol* **14**, 231-239.
- Hossner, K.L., Holland, M.D., Williams, S.E., Wallace, C.R., Niswender, G.D., Odde, K.G. (1997)** Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. II. Maternal profiles. *Domest Anim Endocrinol* **14**, 316-324.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., Biniszkiewicz, D., Yanagimachi, R. und Jaenisch, R. (2001)** Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* **293**, 95-97.
- Hwa, V., Oh, Y. und Rosenfeld, R. (1999)** The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily. *Endocr Rev* **20**, 761-787.
- Irving, J. und Lala, P. (1995)** Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* **217**, 419-427.
- Isaksson, O., Jansson, J. und Gause, I. (1982)** Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* **216**, 1237-1239.
- Iwamoto, H., Murray, M. und Chernausek, S. (1992)** Effects of acute hypoxemia on insulin-like growth factors and their binding proteins in fetal sheep. *Am J Physiol* **263**, E1151-1156.
- Jackson, J., Lindroth, A., Cao, X. und Jacobsen, S. (2002)** Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**, 556-560.

- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. und Jaenisch, R. (2001)** Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* **27**, 31-39.
- Jadot, M., Lin, L., Sleat, D., Sohar, I., Hsu, M., Pintar, J., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. und Lobel, P. (1999)** Subcellular Localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* **274**, 21104-21113.
- Jones, C., Lafeber, H., Price, D. und Parer, J. (1987)** Studies on the growth of the fetal guinea pig: effects of reduction in uterine blood flow on the plasma sulphation-promoting activity and on the concentration of insulin-like growth factor I and -II. *J Development Physio* **9**, 181-201.
- Jones, J., D'Ercole, A., Camacho-Hubner, C. und Clemmons, D. (1991)** Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects of the affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7481-7485.
- Jones, J. und Clemmons, D. (1995)** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**, 3-34.
- Jones, J., Doerr, M. und Clemmons, D. (1995)** Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res* **6**, 319-327.
- Jones, P. und Takai, D. (2001)** The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-1070.
- Kagami, M., Nagai, T., Fukami, M., Yamazawa, K. und Ogata, T. (2007)** Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* **24**, 131-136.

- Kang, J., Bell, J., Leaf, A., Beard, R. und Chandraratna, R. (1998)** Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13687-13691.
- Keefer, C., Stice, S. und Matthews, D. (1994)** Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol Reprod* **50**, 935-939.
- Kiess, W., Blickenstaff, G., Sklar, M., Thomas, C., Nissley, S. und Sahagian, G. (1988)** Biochemical Evidence That the Type II Insulin-like Growth factor Receptor Is Identical to the Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J Biol Chem* **263**, 9339-9344.
- Kim, H., Nagalla, S., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. und Rosenfeld, R. (1997)** Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12981-12986.
- Kind, K., Owens, J., Robinson, J., Quinn, K., Grant, P., Walton, P., Gilmour, R. und Owens, P. (1995)** Effect of restriction of placental growth on expression of IGFs in fetal sheep: relationship to fetal growth, circulating IGFs and binding proteins. *J Endocrinol* **146**, 23-34.
- Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B. und Leiser, R. (1999)** DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* **20**, 451-458.
- Knijn, H., Wrenzycki, C., Hendriksen, P., Vos, P., Zeinstra, E., van der Weijden, G., Niemann, H. und Dieleman, S. (2005)** In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fert Dev* **17**, 775-784.

- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Lincoln, D. und Waters, M. (1997)** Differential expression of the growth hormone receptor and its transcript in bovine uterus and placenta. *Mol Cell Endocrinol* **131**, 127-136.
- Kohan-Ghadr, H., Lefebvre, R., Fecteau, G., Smith, L., Murphy, B., Suzuki Jun., J., Girard, C. und Hélie, P. (2008)** Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology* **69**, 218-230.
- Kornfeld, S. (1992)** Structure and function of mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Annu Rev Biochem* **61**, 307-330.
- Kruip, T., Bevers, M. und Kemp, B. (2000)** Enviroment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* **53**, 611-618.
- Lage, J. (1991)** Placentomegaly with massive hydrops of placental stem villi, diploid DNA content, and fetal omphaloceles: possible association with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Pathol* **22**, 591-597.
- Lau, M., Stewart, C., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P. und Stewart, C. (1994)** Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* **8**, 2953-2963.
- Laviola, L., Perrini, S., Belsanti, G., Natalicchio, A., Montrone, C., Leonardini, A., Vimercati, A., Scioscia, M., Selvaggi, L., Giorgino, R., Greco, P. und Giorgino, F. (2005)** Intrauterine growth restriction in humans is associated with abnormalities in placental insulin-like growth factor signaling. *Endocrinology* **146**, 1498-1505.
- Lawrence, J., Oxvig, C., Overgaard, M., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G., Hays, L., Yates, J.r. und Conover, C. (1999)** The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3149-3153.

- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H. und Galli, C. (2002)** Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* **67**, 767-775.
- Leal, S., Liu, Q., Huang, S. und Huang, J. (1997)** The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* **272**, 20572-20576.
- Leal, S., Huang, S. und Huang, J. (1999)** Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor-beta receptor in mink lung epithelial cells. *J Biol Chem* **274**, 6711-6717.
- Lee, C., Chung, C. und Simmen, F. (1993)** Ontogeny of the porcine insulin-like growth factor system. *Mol Cell Endocrinol* **93**, 71-80.
- Lee, M. und Feinberg, A. (1998)** Genomic imprinting of a human apoptosis gene homologue, TSSC3. *Cancer Res* **58**, 1052-1056.
- Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A. und Ishino, F. (2002)** Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* **129**, 1807-1817.
- Lee, R., Peterson, A., Donnison, M., Ravelich, S., Ledgard, A., Li, N., Oliver, J., Miller, A., Tucker, F., Breier, B. und Wells, D. (2004)** Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod* **70**, 1-11.
- Leighton, P., Saam, J., Ingram, R., Stewart, C. und Tilghman, S. (1995)** An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev* **9**, 2079-2089.

- Leiser, R. (1975)** Development of contact between trophoblast and uterine epithelium during the early stages on implantation in the cow. *Zentralbl Veterinarmed [C]* **4**, 63-86.
- Leiser, R. und Kaufmann, P. (1994)** Placenta structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* **120**, 122-134.
- Lengauer, C., Kinzler, K. und Vogelstein, B. (1997)** DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2545-2550.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. und Roberts, C. (1995)** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* **16**, 143-160.
- LeRoith, D., Bondy, C., Yakar, S., LIU, J. und Butler, A. (2001)** The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocr Rev* **22**, 53-74.
- Li, J., Owens, J., Owens, P., Saunders, J., Fowden, A. und Gilmour, R. (1996)** The ontogeny of hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in the sheep fetus during late gestation: development regulation by cortisol. *Endocrinology* **137**, 1650-1657.
- Li, S., Li, Y., Yu, S., Du, W., Zhang, L., Dai, Y., Liu, Y. und Li, N. (2007)** Expression of insulin-like growth factors systems in cloned cattle dead within hours after birth. *Mol Reprod Dev* **74**, 397-402.
- Lim, M., Riedel, H. und Liu, F. (2004)** Grb10: more than a simple adaptor protein. *Front Biosci* **9**, 387-403.
- Liu, J., Baker, J., Perkins, A., Robertson, E. und Efstratiadis, A. (1993)** Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (IGF1r). *Cell* **75**, 59-72.

- Loi, P., Clinton, M., Vackova, I., Fulka, J.j., Feil, R., Palmieri, C., Della Salda, L. und Ptak, G. (2006)** Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology* **65**, 1110-1121.
- Lok, F., Owens, J., Mundy, L., Robinson, J. und Owens, P. (1996)** Insulin-like growth factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol* **270**, R1148-1155.
- Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Pintado, B., de la Fuente, J. und Boland, M. (2003)** Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* **66**, 297-305.
- Louvi, A., Accili, D. und Efstratiadis, A. (1997)** Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol* **189**, 33-48.
- Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A., Davenport, M. und Efstratiadis, A. (1996)** Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev Biol* **177**, 517-535.
- Lyko, F., Stach, D., Brenner, A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Wirtz, M., Wiessler, M. und Schmitz, O. (2004)** Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Electrophoresis* **25**, 1530-1535.
- Maxfield, E., Sinclair, K., Dunne, L., Broadbent, P., Robinson, J., Stewart, E., Kyle, D. und Maltin, C. (1998)** Temporary exposure of ovine embryos to an advanced uterine environment does not affect fetal weight but alters fetal muscle development. *Biol Reprod* **59**, 321-325.

- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. und Haaf, T. (2000)** Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-502.
- McCowan, L. und Becroft, D. (1994)** Beckwith-Wiedemann syndrome, placental abnormalities, and gestational proteinuric hypertension. *Obstet Gynecol* **83**, 813-817.
- McGrath, J. und Solter, D. (1984)** Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 178-183.
- McLaughlin, K., Szabó, P., Haegel, H. und Mann, J. (1996)** Mouse embryos with paternal duplication of an imprinted chromosome 7 region die at midgestation and lack placental spongiotrophoblast. *Development* **122**, 265-270.
- McLaughlin, K., Solter, D. und Mann, J. (1997)** Developmental consequences of two paternal copies of imprinted chromosome region distal 7 in mice. *J Cell Physiol* **173**, 242-246.
- Mergenthaler, S., Blagitko-Dorfs, N., Wollmann, H., Ranke, M., Ropers, H., Kalscheuer, V. und Eggermann, T. (2000)** Identification of two new polymorphisms (c2447-125A>G; c2532G>A) in the gamma 2-COP (COPG2) gene by screening of Silver-Russell syndrome patients. *Hum Mutat* **16**, 96.
- Miglino, M., Pereira, F., Visintin, J., Garcia, J., Meirelles, F., Rumpf, R., Ambrósio, C., Papa, P., Santos, T., Carvalho, A., Leiser, R. und Carter, A. (2007)** Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology* **68**, 604-617.
- Miles, J., Farin, C., Rodriguez, K., Alexander, J. und Farin, P. (2004)** Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* **71**, 1919-1926.

- Miles, J., Farin, C., Rodriguez, K., Alexander, J. und Farin, P. (2005)** Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biol Reprod* **73**, 663-671.
- Mills, N., D'Ercole, A., Underwood, L. und Ilan, J. (1986)** Synthesis of somatomedin C/insulin-like growth factor I by human placenta. *Mol Biol Rep* **11**, 231-236.
- Modric, T., Silha, J., Shi, Z., Gui, Y., Suwanichkul, A., Durham, S., Powell, D. und Murphy, L. (2001)** Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice. *Endocrinology* **142**, 1958-1967.
- Monk, M., Boubelik, M. und Lehnert, S. (1987)** Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**, 371-382.
- Monk, M. und Grant, M. (1990)** Preferential X chromosome inactivation, DNA methylation and imprinting. *Development Suppl*, 55-62.
- Moore, T. und Haig, D. (1991)** Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* **7**, 45-49.
- Moore, K., Kramer, J., Rodriguez-Sallaberry, C., Yelich, J. und Drost, M. (2007)** Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced in vitro or by nuclear transfer. *Theriogenology* **68**, 717-727.
- Morrione, A., Valentinis, B., Li, S., Ooi, J., Margolis, B. und Baserga, R. (1996)** Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* **56**, 3165-3167.

- Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S., Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1997)** Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3777-3782.
- Mossman, H. (1937)** Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Cornegie Institute Contributions to Embryology* **26**, 129-246.
- Naimeh, L., Schutte, B., Hamilton, W. und Tsalikian, E. (2001)** Ontogeny of the H19 gene in sheep and effect of maternal fasting on its expression in the fetus. *Endocr Res* **27**, 417-431.
- Nicholls, R. und Knepper, J. (2001)** Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**, 153-175.
- Niemann, H. und Wrenzycki, C. (2000)** Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* **53**, 21-34.
- Nissley, P. und Kiess, W. (1991)** Reciprocal modulation of binding of lysosomal enzymes and insulin-like growth factor-II (IGF-II) to the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor. *Adv Exp Med Biol* **293**, 311-324.
- O'Dell, S. und Day, I. (1998)** Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 767-771.
- Oh, Y., Müller, H., Lamson, G. und Rosenfeld, R. (1993)** Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* **268**, 14964-14971.

- Oh, Y., Nagalla, S., Yamanka, Y., Kim, H., Wilson, E. und Rosenfeld, G. (1996)** Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7. Rekombinant human mac25 protein specifically binds IGFI and II. *J Biol Chem* **271**, 30322-30325.
- Ohlsen, S., Lugenbeel, K. und Wong, E. (1994)** Characterization of the linked ovine insulin and insulin-like growth factor-II genes. *DNA Cell Biol* **13**, 377-388.
- Okano, M., Bell, D., Haber, D. und Li, E. (1999)** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- Olson, L., Zhang, J., Dahms, N. und Kim, J. (2002)** Twists and Turns of the Cation-dependent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J Biol Chem* **277**, 10156-10161.
- Onyango, P., Miller, W., Lehoczky, J., Leung, C., Birren, B., Wheelan, S., Dewar, K. und Feinberg, A. (2000)** Sequence and comparative analysis of the mouse 1-megabase region orthologous to the human 11p15 imprinted domain. *Genome Res* **10**, 1697-1710; Erratum in: *Genome Res* 2001 Feb;1611(1692):1308.
- Osborn, B., Fowlkes, J., Han, V. und Freemark, M. (1992)** Nutritional regulation of insulin-like growth factor-binding protein gene expression in the ovine fetus and pregnant ewe. *Endocrinology* **131**, 1743-1750.
- Osorio, M., Torres, J., Moya, F., Pezzullo, J., Salafia, C., Baxter, R., Schwander, J. und M, F. (1996)** Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins-1, -2, and -3 in newborn serum: relationships to fetoplacental growth at term. *Early Hum Dev* **46**, 15-26.
- Owens, J., Kind, K., Carbone, F., Robinson, J. und Owens, P. (1994)** Circulating insulin-like growth factor-I and -II and substrate in fetal sheep following restriction of placental growth. *J Endocrinol* **140**, 5-13.

- Özgen, S., Rasch, K., Kropp, G., Schoon, H., Aupperle, H., Sieme, H. und Klug, E. (1997)** Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde* **13**, 533-534.
- Palma, G., Müller, M. und Brem, G. (1997)** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* **110**, 347-353.
- Paula-Lopes, F., Boelhaue, M., Habermann, F., Sinowatz, F. und Wolf, E. (2007)** Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* **76**, 532-541.
- Penchaszadeh, V. (1971)** Beckwith-Wiedemann syndrome (exomphalos-macroglossia-gigantism: EMG syndrome). *Birth Defects Orig Artic Ser* **7**, 284-285.
- Pennisi, E. (2001)** Behind the Scenes of Gene Expression. *Science* **293**, 1064-1067.
- Perks, C. und Holly, J. (2003)** The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer. *Breast Dis* **18**, 45-60.
- Ravelich, S., Breier, B., Reddy, S., Keelan, J., Wells, D., Peterson, A. und Lee, R. (2004)** Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1, 2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biol Reprod* **70**, 430-438.
- Rechler, M. (1993)** Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* **47**, 1-114.
- Reik, W., Dean, W. und Walter, J. (2001)** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Reik, W. und Walter, J. (2001)** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**, 21-32.

- Reik, W., Santos, F. und Dean, W. (2003)** Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* **59**, 21-32.
- Remmele, W. und Stegner, H. (1987)** Immunhistologischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe – Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Frauenarzt* **2**, 41-43.
- Reynolds, L., Millaway, D., Kirsch, J., Infeld, J. und Redmer, D. (1990)** Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. *J Reprod Fertil* **89**, 213-222.
- Reynolds, T., Stevenson, K. und Wathes, D. (1997)** Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system early placental development in the ewe. *Endocrinology* **138**, 886-897.
- Richards, E. und Elgin, S. (2002)** Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Rinderknecht, E. und Humbel, R. (1978)** The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* **253**, 2769-2776.
- Rosenfeld, R. und Oh, Y. (1998)** Editorial: The Blind Men and the Elephant - A Parable for the Study of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrinology* **139**, 5-7.
- Rüsse, I. (1998)** Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 2. Auflage, Herausgeber: I. Rüsse and F. Sinowatz, Parey-Verlag, Berlin und Hamburg. pp 153-218.
- Russel, D., Baqir, S., Bordignon, J. und Betts, D. (2006)** The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* **73**, 1255-1270.

- Salih, D., Tripathi, G., Holding, C., Szeszak, T., Gonzalez, M., Carter, E., Cobb, L., Eisemann, J. und Pell, J. (2004)** Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4314-4319.
- Salmon, W. und Daughaday, W. (1957)** A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* **49**, 825–826.
- Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992)** Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-391.
- Schnorr, B. und Kressin, M. (2001)** Altersbeurteilung der Frucht. In: *Embryologie der Haustiere*, Herausgeber: B. Schnorr und M. Kressin, Enke-Verlag, Stuttgart. pp 72-74.
- Schoon, H. (1989)** *Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität*, Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Schuler, G., Wirth, C., Klisch, K., Failing, K. und Hoffmann, B. (2000)** Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between Day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. *Reprod Domest Anim* **35**, 157-162.
- Schuler, G., Wirth, C., Teichmann, U., Failing, K., Leiser, R., Thole, H. und Hoffmann, B. (2002)** Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* **66**, 976-982.
- Schuler, G., Teichmann, U., Taubert, A., Failing, K. und Hoffmann, B. (2005)** Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine placentomes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**, 107-114.

- Scott, I., Anson-Cartwright, L., Riley, P., Reda, D. und JC, C. (2000)** The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* **20**, 530-541.
- Senior, P., Tucci, J., Blythe, N. und Beck, F. (1996)** Expression of IGF-II and H19 mRNA in the neonatal rat during normal maturation and after dexamethasone administration. *J Mol Endocrinol* **17**, 217-223.
- Shiura, H., Miyoshi, N., Konishi, A., Wakisaka-Saito, N., Suzuki, R., Muguruma, K., Kohda, T., Wakana, S., Yokoyama, M., Ishino, F. und Kaneko-Ishino, T. (2005)** Meg1/Grb10 overexpression causes postnatal growth retardation and insulin resistance via negative modulation of the IGF1R and IR cascades. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 909-916.
- Silha, J. und Murphy, L. (2002)** Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* **143**, 3711-3714.
- Sinclair, K., Young, L., Wilmut, I. und McEvoy, T. (2000)** In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod* **15 Suppl**, 68-86.
- Sjogren, K., Liu, J., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O., Jansson, J. und Ohlsson, C. (1999)** Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7088-7092.
- Sleutels, F., Zwart, R. und Barlow, D. (2002)** The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* **415**, 810-813.
- Smink, J., Gresnigt, M., Hamers, N., Koedam, J., Berger, R. und van Buul-Offers, S. (2003)** Short-term glucocorticoid treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate. *J Endocrinol* **177**, 381-388.

- Smith, S., Everts, R., Tian, X., Du, F., Sung, L., Rodriguez-Zas, S., Jeong, B., Renard, J., Lewin, H. und Yang, X. (2005)** Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by blastocyst stage after cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17582-17587.
- Smith, C., Berg, D., Beaumont, S., Standley, N., Wells, D. und Pfeffer, P. (2007)** Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* **133**, 231-242.
- Sobiraj, A. (1992)** *Untersuchungen zur Morphologie sowie zur Histochemie und Biochemie des Uterus bei Rindern in der frühen postpartalen Periode*, Habilitationsschrift des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Sohar I., Sleat, D., Gong Lin, C., Ludwig, T. und Lobel, P. (1998)** Mouse mutants lacking the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor are impaired in lysosomal enzyme transport: comparison of cation-independent and cation-dependent mannose 6-phosphate receptor-deficient mouse. *Biochem J* **330**, 903-908.
- Sohda, T., Oka, Y., Iwata, K., Gunn, T., Kamimura, S., Shijo, H., Okumura, M. und Yun, K. (1997)** Co-localisation of insulin-like growth factor II and the proliferation marker MIB1 in hepatocellular carcinoma cells. *J Clin Pathol* **50**, 135-137.
- Steven, D. (1975)** Anatomy of the placental barrier. In: *Comparative Placentation: Essays in Structure and Function*, Ed: D.H. Steven, Academic Press, New York. pp 25-56.
- Stice, S., Strelchenko, N., Keefer, C. und Matthews, L. (1996)** Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* **54**, 100-110.

- Stöger, R., Kubicka, P., Liu, C., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H. und Barlow, D. (1993)** Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* **73**, 61-71.
- Strahl, H. (1906)** Die Embryohüllen der Säugetiere und die Placenta. In: *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*, Ed: O. Hertwig, Fischer-Verlag, Jena. pp 235-368.
- Straus, D., Ooi, G., Orlowski, C. und Rechler, M. (1991)** Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* **128**, 518-525.
- Sun, F., Dean, W., Kelsey, G., Allen, N. und Reik, W. (1997)** Transactivation of Igf2 in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **389**, 809-815.
- Tamaru, H. und Selker, E. (2001)** A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277-283.
- Tarantal, A. und Gargosky, S. (1995)** Characterization of the insulin-like growth factor (IGF) axis in the serum of maternal and fetal macaques (*Macaca mulatta* and *Macaca Fasciculains*). *Growth Regulation* **5**, 190-198.
- Thurston, A., Lucas, E., Allegrucci, C., Steele, W. und Young, L. (2007)** Region-specific DNA methylation in the preimplantation embryo as a target for genomic plasticity. *Theriogenology* **68**, 98-106.
- Tilley, R., McNeil, C., Ashworth, C., Page, K. und McArdle, H. (2007)** Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs. *Domest Anim Endocrinol* **32**, 167-177.
- Turgut, S., Kaptanoglu, B., Emmungil, G. und Turgut, G. (2006)** Increased plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein 3 in pregnant rats with exercis. *Tohoku J Exp Med* **208**, 75-81.

- van Wagtendonk-de Leeuw, A., Aerts, B., den Daas, J. (1998)** Abnormal offspring following in vitro production of bovine praeimplantation embryos. *Theriogenology* **49**, 883-894.
- van Wagtendonk-de Leeuw, A., Mullaart, E., de Roos, A., Merton, J., den Daas, J., Kemp, B., de Ruigh, L. (2000)** Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* **53**, 575-597.
- Waddington, C. (1959)** Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* **183**, 1654-1655.
- Walker, S., Heard, T. und Seamark, R. (1992)** In vitro culture of sheep embryos with co-culture: success and perspectives. *Theriogenology* **37**.
- Walker, S., Hartwich, K. und Seamark, R. (1996)** The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* **45**, 111-120.
- Wang, H., Wang, H., Shen, W., Huang, H., Hu, L., Ramdas, L., Zhou, Y., Liao, W., Fuller, G. und Zhang, W. (2003)** Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* **63**, 4315-4321.
- Wang, G., Hu, L., Fuller, G. und Zhang, W. (2006)** An Interaction between Insulin-like Growth Factor-binding Protein 2 (IGFBP2) and Integrin $\alpha 5$ Is Essential for IGFBP2-induced Cell Mobility. *J Biol Chem* **281**, 14085-14091.
- Wang, L., Balas, B., Christ-Roberts, C., Kim, R., Ramos, F., Kikani, C., Li, C., Deng, C., Reyna, S., Musi, N., Dong, L., DeFronzo, R. und Liu, F. (2007)** Peripheral disruption of the Grb10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo. *Mol Cell Biol* **27**, 6497-6505.

- Warzych, E., Wrenzycki, C., Peippo, J. und Lechniak, D. (2007)** Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* **74**, 280-289.
- Wathes, D., Reynolds, T., Robinson, R. und Stevenson, K. (1998)** Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* **81**, 1778-1789.
- Watson, A., de Sousa, P., Caveny, A., Barcroft, L., Natale, D., Urquhart, J. und Westhusin, M. (2000)** Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod* **2**, 355-365.
- Weksberg, R., Shen, D., Fei, Y., Song, Q. und Squire, J. (1993)** Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* **5**, 143-150.
- Weksberg, R., Smith, A., Squire, J. und Sadowski, P. (2003)** Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12**, R61-68.
- Wells, D., Misica, P., Day, T. und Tervit, H. (1997)** Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol Reprod* **57**, 385-393.
- Westergaard, J., Teisner, B. und Grudzinskas, J. (1983)** Serum PAPP-A in normal pregnancy: relationship to fetal and maternal characteristics. *Arch Gynecol* **233**, 211-215.
- Wetterau, L., Moore, M., Lee, K., Shim, M. und Cohen, P. (1999)** Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Genet Metab* **68**, 161-181.

- Willadsen, S., Janzen, R., McAlister, R., Shea, B., Hamilton, G. und McDermid, D. (1991)** The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* **35**, 161-170.
- Wilson, J., Williams, J., Bondiolo, K., Looney, C., Westhusin, M. und McCalla, D. (1995)** Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* **38**, 73-83.
- Wimsatt, W. (1951)** Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am J Anat* **89**, 233-281.
- Wood, T. (1995)** Gene-targeting and transgenic approaches to IGF and IGF binding protein function. *Am J Physiol* **269**, E613-622.
- Wooding, F. and Wathes, D. (1980)** Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil* **59**, 425-430.
- Wooding, F., Staples, L. and Peacock, M. (1982)** Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation. *J Anat* **134**, 507-516.
- Wooding, F. (1992)** Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13**, 101-113.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. und Niemann, H. (1999)** Alterations in the relative abundance of transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* **53**, 8-18.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D. und Niemann, H. (2003)** Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod* **68**, 2073-2080.

- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K. und Niemann, H. (2004)** Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci* **82-83**, 593-603.
- Wrenzycki, C. (2007)** Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität. *J Reproduktionsmedizin Endokrinologie* **5**, 234-239.
- Wutz, A., Smrzka, O., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E. und Barlow, D. (1997)** Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **389**, 745-749.
- Wutz, A., Theussl, H., Dausman, J., Jaenisch, R., Barlow, D. und Wagner, E. (2001)** Non-imprinted Igf2r expression decreases growth and rescues the Tme mutation in mice. *Development* **128**, 1881-1887.
- Yakar, S., Liu, J., Stannrad, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B. und LeRoith, D. (1999)** Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7324-7329.
- Yakar, S., Wu, Y., Setser, J. und Rosen, C. (2002)** The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine* **19**, 239-248.
- Yamanaka, Y., Wilson, E., Rosenfeld, R. und Oh, Y. (1997)** Inhibition of Insulin Receptor Activation by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins. *J Biol Chem* **272**, 30729-30734.
- Young, L., Sinclair, K. und Wilmut, I. (1998)** Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **3**, 155-163.
- Young, L. und Fairburn, H. (2000)** Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* **53**, 627-648.

- Young, L., Fernandes, K., McEvoy, T., Butterwith, S., Gutierrez, C., Carolan, C., Broadbent, P., Robinson, J., Wilmut, I. und Sinclair, K. (2001)** Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* **27**, 153-154.
- Young, L., Schnieke, A., McCreath, K., Wieckowski, S., Konfortova, G., Fernandes, K., Ptak, G., Kind, A., Wilmut, I., Loi, P. und Feil, R. (2003)** Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev* **120**, 1433-1442.
- Zhang, M., Faugere, M., Malluche, H., Rosen, C., Chernausek, S. und Clemens, T. (2003)** Paracrine overexpression of IGFBP-4 in osteoblasts of transgenic mice decreases bone turnover and causes global growth retardation. *J Bone Miner Res* **18**, 836-843.
- Zhou, J. und Bondy, C. (1992)** Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology* **131**, 1230-1240.
- Zollers, W.J., Babischkin, J., Pepe, G. und Albrecht, E. (2001)** Developmental regulation of placental insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-1 and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy. *Biol Reprod* **65**, 1208-1214.

9. ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| AI | künstliche Besamung |
| AIR | Antisense-IGF2-R-RNA |
| ANOVA | analysis of variance (Varianzanalyse) |
| AOS | Abnormal Offspring Syndrome |
| AS | Angelman-Syndrome |
| bp | basepair → Basenpaare |
| BWS | Beckwith-Wiedeman Syndrome |
| CpG-Insel | DNA-Abschnitt mit > 55 % Guanin und Cytosin, Länge > 500 bp |
| DMR | Differentially Methylated Region |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dnmt | DNA-Methyltransferase |
| Grb10 | Growth Factor Receptor bound Protein-10 |
| GH | Growth hormone (Wachstumshormon) |
| IGF | Insulin-Like Growth Factor |
| IGFBP | Insulin-Like Growth Factor Binding Protein |
| IGFBPrP | Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-related Protein |
| IGF1 | Insulin-Like Growth Factor-1 |
| IGF2 | Insulin-Like Growth Factor-2 |
| IGF1-R | Insulin-Like Growth Factor-1-Rezeptor |
| IGF2-R | Insulin-Like Growth Factor-2-Rezeptor |
| InsR | Insulin-Rezeptor |
| IRS | immunreaktiver Score |
| IUGR | Intrauterine Growth Retardation/Restriction |
| IVP | in vitro-Produktion von Embryonen |
| kDa | kilo Dalton |
| LOS | Large Offspring Syndrome |
| LPS | Large Placenta Syndrome |

| | |
|-------------|---|
| Man6P-R | Mannose-6-Phosphat-Rezeptor |
| Mb | Mega basepair |
| MEST | Mesoderm specific Transkript |
| MOET | Multiple Ovulation Embryo Transfer (konventioneller Embryotransfer) |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| mUPD | maternale Uniparentale Disomie |
| NRDS | Neonatal Respiratory Distress Syndrome |
| P | Promoter |
| PEG1 | Paternally expressed Gen 1 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pUPD | paternale Uniparentale Disomie |
| PWS | Prader-Willi Syndrom |
| RGD | Aminosäuren-Abfolge Arginin-Glycin-Asparaginsäure |
| RGE | Relative Genexpression |
| RT-PCR | Reverse Transkriptions-Polymerasen Kettenreaktion |
| SCNT | Somatic Cell Nucleus Transfer (somatisches Klonen) |
| SRS | Silver-Russell Syndrome |
| TGF β | Transforming Growth Factor beta |
| TRZ | Trophoblastriesenzellen |
| UPD | Uniparentale Disomie |
| UTZ | uninukleäre Trophoblastzellen |

9.2. Bisher aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen

9.2.1. Abstracts für Poster und Vorträge

Immunolocalization of Insulin-like Growth Factor 2 Receptor in bovine placentomes throughout gestation and at parturition. P. Richterich, S. Hiendleder, G. Schuler (Reprod Dom Anim 2006, 41, Suppl. 1, 29). 39. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung in Hannover.

Expression of Insulin-like Growth Factor System Members in Bovine Placentomes. P. Richterich, S. Hiendleder, B. Hoffmann, G. Schuler (Reprod Dom Anim 2007, 42, Suppl. 1, 26); 40. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung in Berlin.

Expression von Komponenten des Insulin-like Growth Factor Systems in Rinderplazentomen. P. Richterich, B. Hoffmann, G. Schuler (Tagungsband 2007, Seite 54); Deutsche Buiatrische Gesellschaft – „Buiatrik am Beginn des 21. Jahrhunderts – aktueller Stand und Perspektiven“, DVG in Fulda.

Expression of Insulin-like Growth Factor (IGF) System Components in Bovine Placentomes. P. Richterich, B. Hoffmann, G. Schuler (Reprod Dom Anim 2007, 42, Suppl. 2, 113); 11. Annual Conference of the European Society für Domestic Animal Reproduction (ESDAR) in Celle.

Die Expression des IGF-Systems in Rinderplazentomen im Verlauf der normalen Gravidität und beim Large Offspring Syndrom. P. Richterich, S. Hiendleder, B. Hoffmann, G. Schuler (TIG, 1/2008); Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin in Giessen

Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Bovine Placentomes throughout gestation and at parturition. P. Richterich, K. Meerkamp, B. Hoffmann, G. Schuler (Reprod Dom Anim 2008, 43, Suppl. 1, 26); 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung in Giessen.

Expression of Insulin-like Growth Factor (IGF) System Components in Bovine Placentomes from Normal and LOS Pregnancies. P. Richterich, K. Meerkamp, S. Hiendleder, M. Weppert, HD Reichenbach, B. Hoffmann, G. Schuler (Reprod Dom Anim 2008, 43, Suppl. 1, 26); 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung in Giessen.

9.2.2. Vorträge und Poster ohne Abstracts

Expression of the IGF-System in placentomes from bovine normal and LOS pregnancies. P. Richterich, S. Hiendleder, B. Hoffmann, G. Schuler. 17. Symposium on Pregnancy, Parturition and the Postpartum Period September 2006 in Tartu (Estland).

Expression of Insulin-like Growth Factor Receptors (IGF1-R and IGF2-R) and of their Ligands (IGF1 and IGF2) in Bovine Placentomes. P. Richterich, K. Meerkamp, J. Geyer, S. Hiendleder, B. Hoffmann, G. Schuler. 18. Symposium on Pregnancy, Parturition and the Postpartum Period Juli 2007 in Rauschholzhausen.

Gestational expression profiles for IGF system members in bovine placentomes und Expression of IGF system in bovine placentoms from LOS-vs. MOET-pregnancies. P. Richterich, M. Weppert, H. Reichenbach, S. Hiendleder, B. Hoffmann, G. Schuler. 19. Symposium on Pregnancy, Parturition and the Postpartum Period Oktober 2008 in Gargano – Garda Lake (Italien).

10. DANKSAGUNG

Es gibt zahlreiche Menschen, denen ich es zu verdanken habe, dass ich diese Doktorarbeit schreiben konnte. Mein besonderer Dank gilt vor allem:

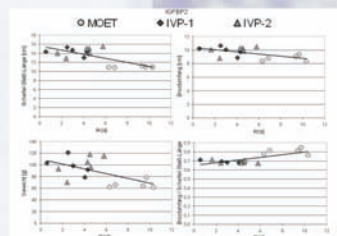
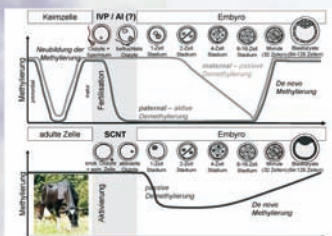
- Prof. Dr. G. Schuler für die Überlassung dieses interessanten Themas, er ist der Beweis, dass ein guter Betreuer Gold wert ist. Ein Dank auch für die Mitnahme zu internationalen Tagungen, wo ich meine Forschungsergebnisse vor allem der freundschaftlichen „PPP“-Gruppe präsentieren konnte.
- Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann für die unterstützende Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen und die Finanzierung dieses Forschungsprojektes sowie das Vertrauen in meine Person, als er mir die Anstellung als Tierarzt in der Ambulanz der KGGA überließ.
- Prof. Dr. S. Hiendleder für die Plazentomproben aus IVP und MOET, denen ein bedeutender Abschnitt in dieser Arbeit eingeräumt ist. Auch seinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, insbesondere M. Weppert und Dr. H.-D. Reichenbach für Durchführung der IVP, des MOET und des eigentlichen Embryotransfers.
- Prof. Dr. J. Geyer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität danke ich für die Möglichkeit meine Real-Time RT-PCRs an seinen Gerätschaften durchzuführen, hier auch ein Dank an K. Meerkamp für die technische Unterstützung.
- Dr. P. Lobel, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA, danke ich für die Bereitstellung des Antikörpers gegen den Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zur immunhistologischen Untersuchung des IGF2-R in den Rinderplazentomen.
- Dr. K. Failing für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

- den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen in der KGGA, mit denen ich eine nette Zeit erleben durfte - sei es nur ein Kaffee und ein gutes Gespräch. Auch allen Mitdoktoranden und –doktorandinnen aus dem Hause sei für ihre Unterstützung bei der Probensammlung gedankt.
- der größte Dank gilt aber sicher meinen Eltern, die mir in vielen Lebenslagen ein Vorbild waren, sind und sein werden. Ohne Mamas Einsatz hätte ich sicher weder mein Studium noch diese Arbeit anfangen können – dafür Danke Mama! Papa zeigte mir eine Arbeitsmoral, der ich gerne nachfolge und hoffe mein Versprechen bislang erfüllt zu haben.
- meinen beiden Geschwistern Ruth Bätz und Claus Richterich, meinen Neffen Jannec und Marek Bätz sowie meiner „family“ danke ich für ihre moralische Unterstützung und der Gewissheit, dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie benötige.
- meinen Freunden aus dem Studium in Giessen, mit denen ich viele tolle Erfahrungen sammeln durfte, die meine Studienzeit unvergesslich machen. Meinen Freunden und Bekannten aus dem Trakehner Verband, wo ich immer wieder viel Freude mit tollen Pferden und netten Leuten habe. Hier ist vor allem Georg Pleister erwähnt, dem ich etwas ganz besonderes verdanke!
- meinem Freund Dr. Holger Thoms, der mich in den letzten siebeneinhalb Jahren durch konstruktive Kritik und liebevolle Hilfe bei vielen Vorhaben und Ideen unterstützt hat.

11. ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Peter Richterich



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5341-9



9 783595 341131 (5)